

**Effekt ontogenetischer Entwicklung und respiratorischer
Veränderungen auf Zusammensetzung und
Säure-Basen-Status der Flüssigkeitskompartimente
von Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Alexander Kaiser

geboren am 18.10.1967 in Hilpoltstein

Präsident der Humboldt Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Bernhard Ronacher

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Heisler
2. Gutachter: Prof. Dr. Karl Crailsheim
3. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Elepfandt

Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 2002

*„Insects don't inherit the earth,
they own it now.“*

Thomas Eisner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iv
Danksagung	vii
Zusammenfassung	viii
Abstract	ix
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	7
2.1 Versuchstiere	7
Vorbereitung der Puppen	9
2.2 Probengewinnung	9
Herstellung von Homogenaten	9
Entnahme von Hämolympfproben	9
2.3 Volumen- und Gewichtsanalyse	10
Trockengewicht und Wassergehalt.	10
Bestimmung des Hämolympfvolumens	10
2.4 Analyse von Hämolymphe und Homogenat	11
Bestimmung der Osmolarität	11
Analyse anorganischer Kationen	11
Chloridbestimmung.	12
Analyse freier Aminosäuren	13
Berechnung der Nettoladung freier Aminosäuren	14
Proteinkonzentrationsbestimmung	15
2.5 Berechnung der Konzentration untersuchter Substanzen im Gewebswasser	16
2.6 Analyse des Kohlendioxidstoffwechsels und korrelierter Variablen	16
Messung von CO ₂ -Abgaberate und Abgabemuster	16
Bestimmung des CO ₂ -Gehalts	17
CO ₂ -Kapazitätskoeffizienten.	19
Physikalischer Löslichkeitskoeffizient und pK-Wert	19
Nichtbikarbonatpufferwert	19
Messung des Hämolympf-pH-Werts <i>in vivo</i>	20
Hämolympf-pH-Wert <i>in vivo</i> bei exogener Hyperkapnie	21
2.7 Statistische Auswertung	22
2.8 Signalerfassung und Datenverarbeitung	22
3. Ergebnisse	23
3.1 Entwicklung von <i>Zophobas rugipes</i>	23

3.2 Gewicht der Versuchstiere	23
3.3 Wassergehalt und Volumen der Kompartimente	23
Gesamtwassergehalt	23
Volumen und Wassergehalt von Hämolymphe und Gewebe	24
3.4 Kationengehalt der Hämolymphe	25
3.5 Kationengehalt des Homogenats	26
3.6 Chloridkonzentration der Hämolymphe	27
3.7 Chloridkonzentration des Homogenats	27
3.8 Proteinkonzentration der Hämolymphe	28
3.9 Proteinkonzentration des Homogenats	28
3.10 Freie Aminosäuren der Hämolymphe	29
Gesamtkonzentration und Nettoladung	29
Konzentration einzelner Aminosäuren	29
3.11 Freie Aminosäuren des Homogenats	31
3.12 Osmolarität der Hämolymphe	32
3.13 Ionenbilanz der Hämolymphe	33
3.14 Konzentration von untersuchten Substanzen im Gewebe	34
3.15 Physikalischer Löslichkeitskoeffizient und pK-Wert	35
3.16 Kohlendioxidgehalt <i>in vitro</i>	35
Hämolymphe	35
Homogenat	36
Gewebe	37
3.17 pH-Bikarbonat-Diagramm und Pufferwert <i>in vitro</i>	38
3.18 Zusammenfassung von <i>in vitro</i> Ergebnissen	39
3.19 <i>in vivo</i> Untersuchungen	40
CO ₂ -Abgabe	40
pH-Wert	44
pH-Wert bei Hyperkapnie	46
Säure-Basen-Status der Hämolymphe	50
3.20 Zusammenfassung von <i>in vivo</i> Ergebnissen	51
4. Diskussion	52
4.1 Versuchstiere	52
4.2 Wasserhaushalt	52
Gesamtwassergehalt	52
Hämolympfvolumen	54
4.3 Inhaltstoffe	56
Anorganische Kationen	56

Chlorid	58
Physiologische Relevanz des Ionenmusters	58
Proteingehalt	60
Aminosäuren.	61
4.4 Ionenbilanz	67
4.5 Osmolarität.	70
4.6 Kohlendioxidgehalt von Hämolymphe, Homogenat und Gewebe	73
4.7 Zusammenfassung der Untersuchungen <i>in vitro</i>	78
4.8 Untersuchungen <i>in vivo</i>: Methodik	78
pH-Elektroden.	78
Handhabung der Puppen und Implantation der Elektroden	78
4.9 Untersuchungen <i>in vivo</i>: Ergebnisse	79
Diskontinuierliche Kohlendioxidabgabe.	79
pH-Wert	81
Zyklische pH-Wert-Änderungen durch diskontinuierliche CO ₂ -Abgabe.	82
Hyperkapnie und Säure-Basen-Status <i>in vivo</i> nach Implantation der Elektroden	86
Hyperkapnie und Anoxie in reiner CO ₂ -Atmosphäre.	90
Kontrolle der CO ₂ -Abgabe	91
4.10 Zusammenfassung der Untersuchungen <i>in vivo</i>	94
Anhang	95
1. Literaturverzeichnis	95
2. Geräte	107
3. Materialien	108
4. Software	108
5. Chemikalien und Reagenzien	109
6. Tabellen.	110
7. Publikationen	125
8. Lebenslauf.	126
9. Erklärung.	127

Danksagung

Vielen Personen, die in den letzten Jahren mein Leben und meine Arbeit begleiteten und mich unterstützten, möchte ich meine Dankbarkeit ausdrücken:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Norbert Heisler für stets offene Türen und Ohren und für die Bereitwilligkeit, sein großes Wissen und seine Erfahrung weiterzugeben.

Meinen Gutachtern, Herrn Prof. Dr. Karl Crailsheim, Karl-Franzens-Universität Graz, und Herrn Prof. Dr. Elepfandt, Humboldt Universität zu Berlin, für die Bereitschaft, einen Teil ihrer wertvollen Zeit für die Begutachtung meiner Dissertation zu opfern.

Meinem langjährigen Freund und Arbeitskollegen Dr. Stefan K. Hetz für seine Offenheit und Hilfsbereitschaft. Ohne ihn hätte ich niemals so viel über Elektronik, Musik und Longdrinks gelernt.

Herrn Dr. Bernhard Leonhard, Karl-Franzens-Universität in Graz, der mich in die Methode der Aminosäurebestimmung einführte und mir bei Problemen mit der HPLC behilflich war.

Meinem Freund und ehemaligen „Hiwi“ Dipl. Biol. Edgar Cristancho für die ausdauernde Hilfe bei langwierigen Messreihen (spanisch zählen kann ich seitdem fließend).

Meinen wissenschaftlichen Mitarbeitern Dipl. Biol. Annabell Wobschall, Dr. Andreas Mölich und Dr. Wolfgang Waser für die kameradschaftliche Zusammenarbeit und die anregenden Diskussions- und Gesprächsrunden.

Den Technischen Assistentinnen Brigitte Geue, Hannelore Schöder und Gabriele Schröpfer für die Unterstützung bei Elektrodenbau, Probenaufbereitung und Messreihen (was wären wir ohne euren geschickten Hände und eure Geduld!).

Frau Gabriele Ziermann für die aufopferungsvolle Pflege der Versuchstiere.

Den studentischen Hilfskräften Roman Klemz und Jens Vanselow für die Bewältigung der eher unangenehmen Aufgaben: Literaturzitate beschaffen, Versuche vorbereiten, Puppen präparieren und Klagen der Doktoranden anhören.

Herrn Dipl. Biol. Arnold Stern für die Hilfe bei technischen Problemen und die Unterstützung bei der PERL-Programmierung. Sein kühler Kopf und seine ruhige Hand brachte noch jeden technischen Defekt wieder in Ordnung.

Herrn Rüdiger Karpinski für die präzise und saubere Werkstattarbeit.

Meinen Eltern, die mich immer unterstützten und mir die Freiheit ließen, das zu tun was ich für richtig hielt.

Vor allem meiner Freundin Gudrun Albrecht, die mir in jeder noch so schwierigen Zeit beisteht und zeigt, dass noch ein Leben neben der Universität existiert.

Zusammenfassung

Der Schwarzkäfer *Zophobas rugipes* lebt in Höhlen im Dung von Fledermäusen. Die Puppen entwickeln sich in dieser Guanoschicht innerhalb von 9 - 12 Tagen. Sie zeigen während der gesamten Entwicklung den für ruhende Insekten typischen diskontinuierlichen Gasaustausch. Die Umgebungsluft im Guano kann durch Zersetzungsprozesse und Luftabschluss wenig Sauerstoff und viel Kohlendioxid enthalten. Die Puppen müssen daher in der Lage sein, externe Hypoxie oder Hyperkapnie zu tolerieren. Da die Stoffwechselrate zu Beginn und zum Ende des Puppenstadiums relativ hoch ist, ändern sich zusätzlich die internen Anforderungen an den Atemgastransport. Ungünstige Lebensbedingungen und sich im Laufe der Entwicklung ändernde Stoffwechselraten erfordern eine respiratorische und metabolische Anpassung der Puppen. Die vorliegende Arbeit untersucht, welchen Einfluss metabolisch gebildetes und atmosphärisches CO₂ auf den Säure-Basen-Haushalt der Puppen von *Zophobas rugipes* hat.

Untersuchungen des Wassergehalts der Puppen zeigten während der gesamten Entwicklung konstante Werte um 60 %. Die Volumina von Hämolymphe (HL) und Gewebe änderten sich durch Histolyse, Histogenese und Resorption von Exuvialflüssigkeit. Die HL zeigte das für omnivore Insekten charakteristische Ionenmuster mit einem [Na⁺]-[K⁺]-Verhältnis von 2,4. [Mg²⁺] in der HL betrug zu Beginn der Entwicklung 83 meq l⁻¹. [Mg²⁺] und [Cl⁻] in der HL fielen im Laufe der Entwicklung ab. Protein- und Aminosäurekonzentrationen änderten sich uneinheitlich. Die Nettoladung der Aminosäuren war während des gesamten Puppenstadiums positiv. Von den proteinogenen Aminosäuren fehlten in der HL Aspartat und Methionin. Prolin diente als Energielieferant. Phenylalanin und Tyrosin wurden zu Beginn der Entwicklung bei der Sklerotisierung metabolisiert und später wieder angereichert. Tryptophan wurde zunächst angereichert und zum Ende der Entwicklung zum Aufbau von Ommochromen verwendet.

CO₂-Kapazität und Puffereigenschaften der Kompartimente änderten sich während der gesamten Entwicklung nicht. Die hohe CO₂-Kapazität der HL korrelierte mit einer hohen Bikarbonatkonzentration. Der *in vitro* bestimmte Nichtbikarbonatpufferwert (β_{NB}) betrug 17,0 meq l⁻¹ pH⁻¹ in der HL und 59,3 meq l⁻¹ pH⁻¹ im Gewebe.

Der zyklische und diskontinuierliche Gasaustausch der Puppen teilte sich in Öffnungsperioden, in denen ein Großteil der CO₂-Abgabe erfolgte ('burst'), und in Interburstperioden mit geringer CO₂-Abgabe. Änderungen des Stoffwechsels während der Entwicklung wurden respiratorisch durch Anpassung des Atemzyklus und nicht durch Anpassung von CO₂-Kapazität oder β_{NB} kompensiert. Messung von atmungsabhängigen Änderungen des pH-Werts in der HL erfolgte durch Implantation von pH-Mikro-Glaselektroden an 26 Puppen. Der pH-Wert der HL *in vivo* betrug 6,65 - 7,11. Die Implantation von pH-Elektroden verursachte eine Erhöhung der Stoffwechselrate und eine Verkürzung der Zyklusdauer. Während der Öffnungsperioden stieg der pH-Wert um etwa 0,01 Einheiten je 100 nmol g⁻¹ CO₂ an. Die Verletzung durch die Implantation verursachte eine metabolische Azidose. Diese Azidose wurde durch den Verlust von Bikarbonat, das als CO₂ abgeatmet wurde, respiratorisch kompensiert. Gleichzeitig sank der P_{CO_2} in der HL auf Werte unter 25,8 Torr (3,4 kPa).

Eine experimentell induzierte Hyperkapnie wurde metabolisch kompensiert. Als Folge stieg der β_{NB} der HL auf 37,7 meq l⁻¹ pH⁻¹.

Je höher der in der HL gemessene pH-Wert, desto kürzer waren Zyklusdauer und Dauer der Öffnungsperiode. Dieser Zusammenhang ließ auf eine Atemregulation durch Wahrnehmung von pH-Wert-Änderungen schließen.

1. Einleitung

Etwa drei Viertel aller bekannten Tierarten und ein Großteil der terrestrischen Biomasse sind in der Klasse der Insekten zu finden. Schätzungen sprechen von zwei bis 18 Millionen rezenten Insektenarten (WEBER & WEIDNER 1974, [L182]). 85 % dieser Arten sind holometabole Insekten, zu denen unter anderem Schmetterlinge, Hautflügler und Käfer gehören. Als holometabol werden sie bezeichnet, weil sich ihre Entwicklung in drei Abschnitte gliedert. Ein Larvalstadium wird über ein Puppenstadium mit dem Adultstadium verbunden. Die drei Stadien haben unterschiedliche Funktionen:

Das Larvalstadium dient als Fress-Stadium, in dem die Larven innerhalb kürzester Zeit drastisch an Gewicht und Größe zunehmen können. Die Raupen des Seidenspinners *Attacus atlas* erhöhen zum Beispiel ihr Anfangsgewicht während einer Zeit von sechs Wochen auf das Zehntausendfache. Sind die Larven ausreichend groß oder schwer, führt die nächste Häutung zum Puppenstadium. Dieses Stadium dient ausschließlich der Umstrukturierung des Organismus. Die für die Larven typischen Organe werden aufgelöst, die frei werdenden Metabolite werden für den Aufbau des adulten Organismus verwendet. Beine, Flügel und Mundwerkzeuge werden gebildet, die Gonaden reifen. Sind die Umbauvorgänge abgeschlossen, schlüpfen aus der Puppenhülle die adulten Insekten. Das Adultstadium dient der Fortpflanzung und der Verbreitung der Art. Puppen können weder Nahrung noch Wasser aktiv aufnehmen, sondern nur gasförmige Substanzen mit der Umgebung austauschen. Sie sind in ihrer Beweglichkeit stark eingeschränkt. Damit sind Puppen sehr gut für experimentelle Untersuchungen geeignet.

Die differenzierte Entwicklung ermöglicht eine unabhängige Anpassung von Larve und Imago an unterschiedlichste Lebensbedingungen. Hierin liegt wohl die Ursache für den Erfolg und die große Artenvielfalt der holometabolen Insekten: ihre artenreichste Ordnung, die Käfer (Coleoptera), bevölkert mit etwa 350 000 Arten die unterschiedlichsten Regionen der Erde (WURMBACH & SIEWING 1985 [L188]).

Alle Insekten besitzen als Atmungsorgan ein Tracheensystem. Es stellt eine luftgefüllte Einstülpung der äußeren chitinösen Körperhülle dar. Die Tracheen verzweigen sich weitläufig und enden blind in mikroskopisch kleinen Tracheolen, die häufig sehr nahe an Zellen oder sogar an Mitochondrien liegen. Organe und Tracheen werden von Hämolymphe umspült. Da der Insektenhämolymphe Sauerstofftransportmoleküle fehlen, muss das Tracheensystem die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff übernehmen.

Der externe Gasaustausch erfolgt über Stigmen, die am Übergang zwischen Tracheensystem und Umgebungsluft an der äußeren Körperwand liegen. TREVIRANUS postulierte dies bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts [L172].

In den Fünfziger Jahren entdeckte PUNT erstmalig, dass Kohlendioxid bei Puppen nicht kontinuierlich, sondern zyklisch und unterbrochen von langen Intervallen abgegeben wird [L144]. Diese damals einzigartige Entdeckung der diskontinuierlichen CO₂-Abgabe wurde mittlerweile bei zahlreichen Insektenarten nachgewiesen [L20][L46][L69][L81][L156]. PUNT postulierte damals, dass die Stigmenverschlussapparate die kontrollierende Instanz des diskontinuierlichen Gasaustausches seien. Die Hypothese wurde 1955 von BUCK & KEISTER gestützt, indem sie Stigmen von Puppen des Seidenspinners *Agapema* mit Glaskanülen intubierten. Der diskontinuierliche Zyklus kam dadurch sofort zum Erliegen [L20]. Ein Jahr später konnte

SCHNEIDERMAN durch langfristige Beobachtung eines Stigmenverschlussapparates und gleichzeitige Aufzeichnung der Kohlendioxidabgaberate bei Seidenspinnerpuppen nachweisen, dass die Stigmen tatsächlich der Regulation der CO_2 -Abgabe dienen [L157]. Den zyklisch auftretenden, durch langandauernde Öffnungsperioden der Verschlussapparate hervorgerufenen plötzlichen Austritt von CO_2 aus den Puppen bezeichnete er als 'burst'. Die Zeit zwischen zwei Öffnungsperioden unterteilte er in Konstriktionsperiode ('constriction') und Flutterperiode ('flutter'). In der Konstriktionsperiode werden die Stigmenverschlussapparate permanent verschlossen, in der Flutterperiode öffnen und schließen sie in schnellem Rhythmus [L158]. Flutter- und Konstriktionsperiode werden häufig als Interburstperiode zusammengefasst.

BUCK erstellte ein theoretisches Modell der diskontinuierlichen Respiration, das durch LEVY & SCHNEIDERMAN bestätigt wurde [L19][L117][L118]: In der Konstriktionsperiode verbrauchen die Gewebe den Sauerstoff aus den Tracheen. Der tracheale Sauerstoffpartialdruck (P_{O_2}) fällt. Gleichzeitig beginnt der tracheale Kohlendioxidpartialdruck (P_{CO_2}) zu steigen. Aufgrund der guten Löslichkeit von CO_2 in Hämolymphe und Gewebe erfolgt der Partialdruckanstieg von CO_2 wesentlich langsamer als der Partialdruckabfall von Sauerstoff. Dadurch fällt der barometrische Druck im Tracheensystem, solange die Stigmenverschlussapparate in der Konstriktionsposition verharren. Mit jedem kurzzeitigen Öffnen der Verschlüsse in der Flutterperiode sorgt dieser Unterdruck für einen konvektiven Einstrom von Luft, der die Diffusion von CO_2 nach außen behindert. Kohlendioxid reichert sich in den Puppen an. Der P_{CO_2} steigt bis zur nächsten Öffnungsperiode stetig an [L115].

Auch die in dieser Arbeit untersuchten Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* (Tenebrionidae, Coleoptera) geben CO_2 zyklisch und diskontinuierlich ab (Abb. 1.1). Das diskontinuierliche Abgabemuster bleibt während der gesamten Entwicklung erhalten.

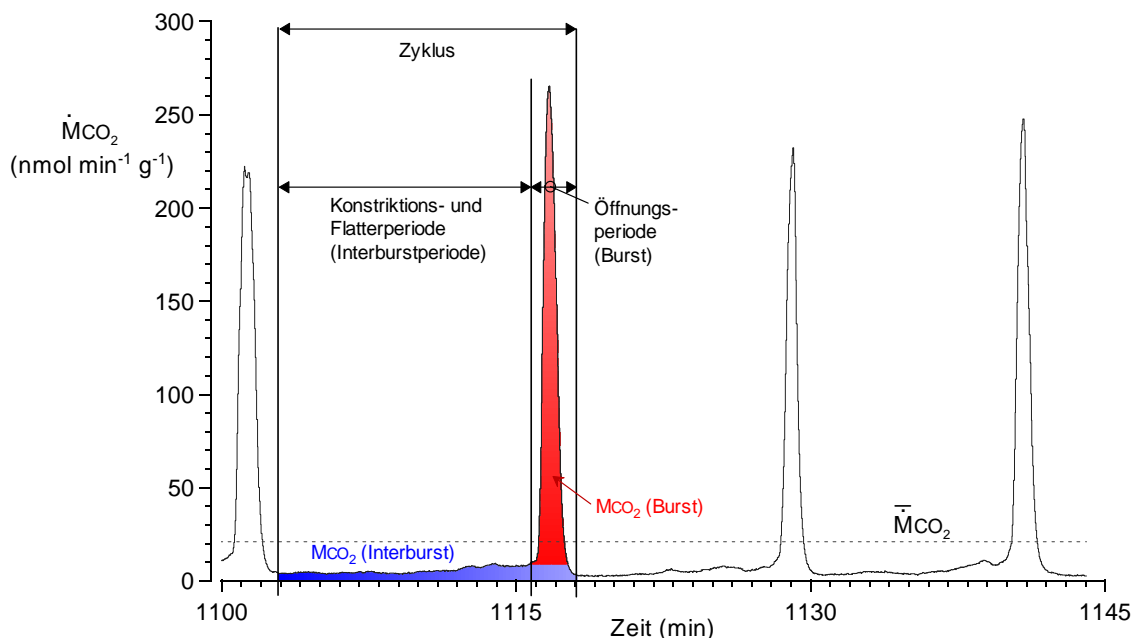


Abbildung 1.1 Zyklische, diskontinuierliche Kohlendioxidabgabe einer Puppe des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Der Zyklus wird unterteilt in Konstriktions-, Flutter- und Öffnungsperiode. Konstriktions- und Flutterperiode werden zur Interburstperiode zusammengefasst. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die durchschnittliche CO_2 -Abgaberate während der dargestellten vier Zyklen.

Originaldaten von Versuchstier: 3652, männlich, 3 Tage alt, 0,713 g

Zu Beginn und am Ende des Puppenstadiums werden doppelt so hohe Stoffwechselraten wie in der intermediären Phase gemessen ([L61][L62], Abb. 1.2). Dieser für Puppenstadien typische U-förmige Verlauf von CO_2 -Abgaberate und Sauerstoffaufnahme rate wird durch stoffwechselintensive Vorgänge wie Häutung, Histolyse und Histogenese beim Übergang von Larve zu Puppe und von Puppe zu Imago verursacht [L3]. Das Muster der Öffnungsperioden ändert sich dabei nur wenig, allein die Zyklusdauer wird den veränderlichen Stoffwechselbedingungen angepasst [L61][L62].

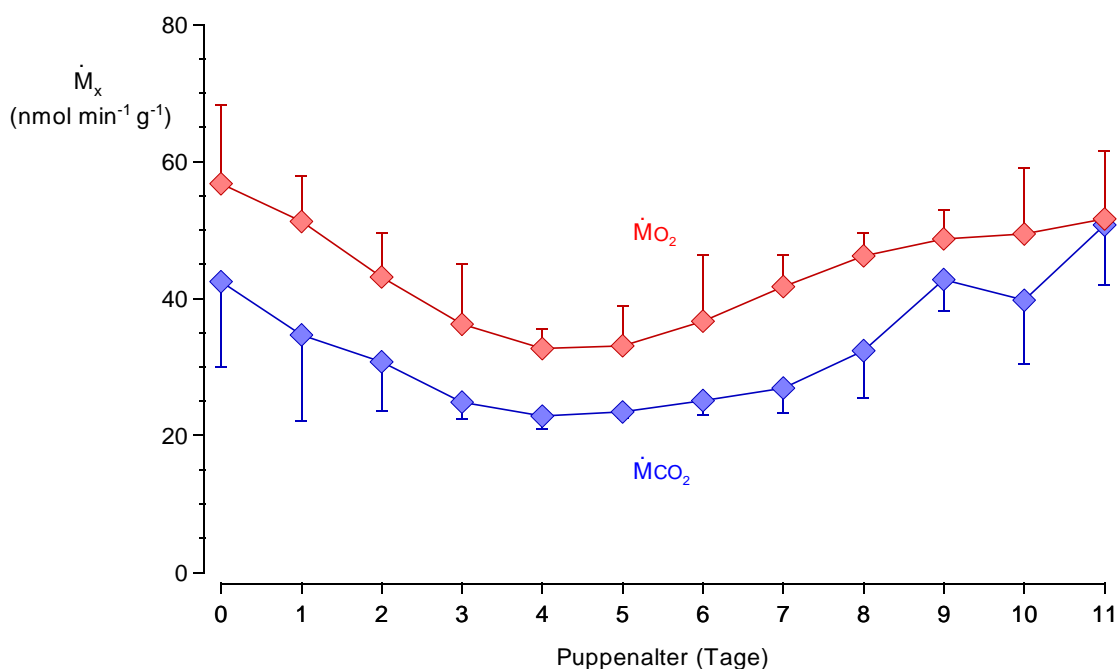
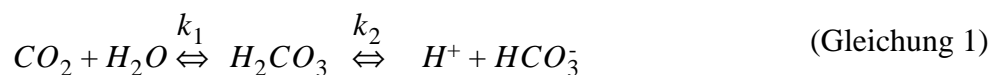


Abbildung 1.2 Sauerstoffaufnahme rate und Kohlendioxidabgaberate während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Zu Beginn und zum Ende des Puppenstadiums sind beide Raten etwa doppelt so hoch wie in der Mitte des Puppenstadiums. Die Raten zeigen den für Puppen typischen U-förmigen Verlauf (Daten aus GIERTH [L61] und GIERTH *et al.* [L62]).

Während ein kontinuierlicher Gasaustausch für sehr konstante Atemgaspartialdrucke im Organismus sorgt, müssen Tiere mit diskontinuierlicher äußerer Atmung mitunter extreme Schwankungen der CO_2 - und O_2 -Partialdrucke verkraften [L82][L117]. Die stete Anreicherung von Kohlendioxid während der Interburstperiode kann gravierende Auswirkungen auf den Organismus haben. Da Kohlendioxid ein Säureanhydrid darstellt, reagiert es in wässrigen Lösungen zu Kohlensäure. Diese Säure dissoziiert unmittelbar in Bikarbonat und Protonen:



Wegen der geringen im Äquilibrium vorliegenden Konzentration von Kohlensäure (0,2 % des physikalisch gelösten CO_2 [L85]), wird Gleichung 1 oft vereinfacht dargestellt:



Die entstehenden Protonen führen zu einer Ansäuerung des inneren Milieus, die in logarithmischer Form vom steigenden Kohlendioxidpartialdruck abhängt. Um die Auswirkungen der Respiration auf den pH-Wert der Puppen von *Zophobas rugipes* zu bestimmen, wurden diskontinuierliche CO₂-Abgabe und pH-Wert der Hämolymphe *in vivo* synchron gemessen.

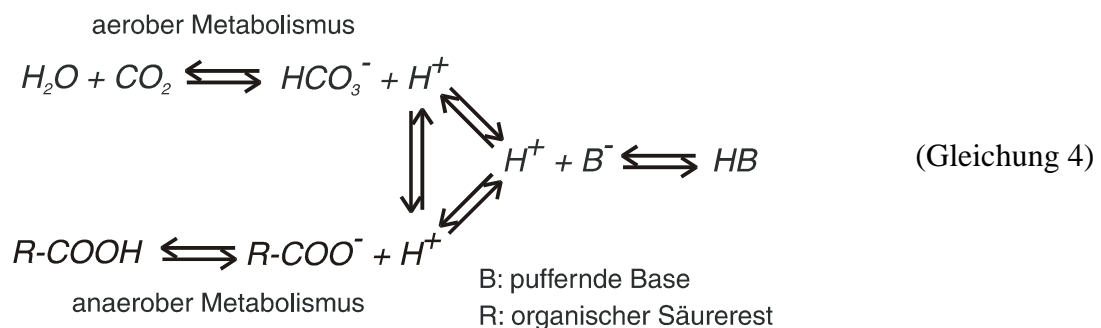
Der Zusammenhang zwischen physikalisch gelöstem CO₂, Bikarbonat und pH-Wert wird durch die HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung verdeutlicht:

$$pH = pK' + \log \left(\frac{[HCO_3^-]}{\alpha \cdot P_{CO_2}} \right) \quad (\text{Gleichung 3})$$

Der pK-Wert errechnet sich aus dem negativen dekadischen Logarithmus der Reaktionsgleichgewichtskonstanten. Er kann aus einer empirisch ermittelten Gleichung nach HEISLER berechnet werden. Der pK-Wert ist abhängig von der Temperatur, dem pH-Wert, der Ionenstärke, der Natriumkonzentration und der Proteinkonzentration der Lösung [L76]. Der physikalische Löslichkeitskoeffizient α gibt die Beziehung zwischen der Konzentration eines Gases und seinem Partialdruck in einem Medium an. Dieser Parameter ist nach einer weiteren empirisch ermittelten Formel nach HEISLER abhängig von der Temperatur und von der Molarität der Lösung [L76]. Beide Parameter können bei Kenntnis der Einfluss nehmenden Variablen berechnet werden.

Einen Hinweis auf die Menge gelöster Substanzen ergibt die Messung der Osmolarität. Gelöste Substanzen in Körperflüssigkeiten sind hauptsächlich die physiologisch relevanten Ionen Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ und Cl⁻. In der Hämolymphe einiger Insektenordnungen sind freie Aminosäuren höher konzentriert, als in der Hämolymphe oder im Blut anderer Tiergruppen [L54][L44][L111][L128][L191]. Bei manchen Arten wurden über 200 mmol l⁻¹ freie Aminosäuren gemessen [L147]. Durch ihre hohe Konzentration beeinflussen sie in erheblichem Maße Osmolarität und Löslichkeit von Gasen. Um den physikalischen Löslichkeitskoeffizienten und den pK-Wert von Hämolymphe und Gewebe der Puppen von *Zophobas rugipes* bestimmen zu können, wurden Osmolarität, ionale Zusammensetzung, Aminosäuregehalt und Proteinkonzentration untersucht und über den gesamten Zeitraum der Puppenentwicklung verfolgt.

Ein in engen Grenzen regulierter pH-Wert ist für die Funktionsfähigkeit eines Organismus unbedingt notwendig [L8]. Aus diesem Grund existieren Mechanismen, die zur Regulation des pH-Werts beitragen. Metabolische Änderungen des pH-Werts können respiratorisch kompensiert werden. Langfristig übernehmen Exkretionsorgane die Regulation des Säure-Basen-Status. Um kurzfristige Schwankungen des pH-Werts zu kompensieren, sind in Hämolymphe und Gewebe Puffer vorhanden, die einen Teil der gebildeten Protonen neutralisieren:



Die Bindung der Protonen bewirkt eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in Gleichung 2 auf Seite 3, wodurch zusätzliche Mengen an Bikarbonat gebildet werden. Die Konzentrationsänderung an Bikarbonat, die auf diese Weise entsteht, ist ein direktes Maß für die puffernde Wirkung des Kompartiments. Sie hängt von der Konzentration der vorhandenen Puffer und vom pK-Wert der beteiligten Reaktionen ab. Dabei spielen Proteine und freie Aminosäuren eine wichtige Rolle. Die Aminosäure Histidin hat einen wesentlichen Einfluss auf die Puffereigenschaften im physiologischen pH-Bereich. Deshalb wurde in dieser Arbeit festgestellt, welche Aminosäuren in welcher Konzentration in Hämolymphe und Gewebe der Puppen von *Zophobas rugipes* vorliegen und die Proteinkonzentration bestimmt.

Die Puppen von *Zophobas rugipes* entwickeln sich in Höhlen in einer teilweise Meter hohen Schicht von Guano in einer kurzen Zeitspanne von 9 - 12 Tagen. Die Umgebungsluft im Guano kann durch Zersetzungsprozesse und Luftabschluss wenig Sauerstoff und viel Kohlendioxid enthalten. Die Puppen müssen deswegen in der Lage sein, neben den veränderlichen Stoffwechselraten während der Entwicklung auch externe Hypoxie oder Hyperkapnie zu kompensieren. Die vorliegende Arbeit untersuchte, ob Änderungen der CO₂-Kapazität oder der Puffereigenschaften von Geweben und Hämolymphe zu dieser Kompensation beitragen. Um Aussagen über die Kapazität und die Pufferfähigkeit der einzelnen Kompartimente in den Puppen zu treffen, wurden Hämolymphe und Gewebe *in vitro* mit Kohlendioxid äquilibriert und der P_{CO_2} abhängige Kohlendioxidgehalt bestimmt. Mit Hilfe der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung wurden Ansäuerung und Anreicherung mit Bikarbonat berechnet und der Pufferwert der Kompartimente während der gesamten Puppenentwicklung bestimmt. Durch eine experimentelle Erhöhung des Kohlendioxidgehalts in der Atemluft wurden Puppen *in vivo* äquilibriert. Ein Vergleich der Ergebnisse *in vitro* und *in vivo* zeigt, ob die Puppen von *Zophobas rugipes* bei atmosphärischer Hyperkapnie eine ausgeprägte Form der Säure-Basen-Regulation zeigen.

2. Material und Methoden

Um den Säure-Basen-Status von *Zophobas rugipes* zu untersuchen, wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Für die Untersuchung der Kompartimentierung wurden Trockengewicht und Wassergehalt von Gewebe und Hämolymphe bestimmt. Kationen, Anionen, Proteine und Aminosäuren wurden als Inhaltsstoffe identifiziert und analysiert. Die CO₂-Sättigungsfunktionen der Kompartimente *in vitro* wurden bestimmt. Zuletzt wurde eine respirationsabhängige pH-Messung *in vivo* durchgeführt und die Auswirkungen einer respiratorischen Azidose durch Hyperkapnie untersucht.

2.1 Versuchstiere

Zophobas rugipes ist eine Käferart aus der Familie der Schwarzkäfer oder Tenebrioniden. Die Tiere sind weit verbreitet von Mexiko bis Brasilien und von Kuba bis zu den Kleinen Antillen [L137]. Der gesamte Lebenszyklus des höhlenbewohnenden Käfers läuft im Dung von Fledermäusen ab, die die Höhlen als Ruheplatz nutzen [L174]. Die Larven und die flugunfähigen Adulttiere ernähren sich von Aas und Fledermausdung [L137].



Abbildung 2.1 Entwicklungsstadien des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die Puppe mit ihren nach außen sichtbaren Extremitätenanlagen wird als *pupa libera* bezeichnet. Die Käfer sind flugunfähig. Es besteht kein auffälliger Geschlechtsdimorphismus (Fotos mit freundlicher Genehmigung von S. K. Hetz; Abbildungen nicht maßstabsgetreu, Größenangaben siehe Text).

Die Larven dieser und anderer Schwarzkäferarten werden häufig als Futtermittel für Reptilien verwandt. Im Jahr 1998 wurden etwa 20 Larven von *Zophobas rugipes* von einem Futterhändler für den Aufbau einer kontinuierlichen Zucht gekauft. Aus dieser Anzahl entwickelten sich in unseren Laboratorien seitdem über 12 Generationen mit Tausenden von Käfern.

Die adulten Tiere werden in Kunststoffboxen (30 × 50 × 20 cm) auf Weizenkleie als Substrat gehalten. Eierschachteln dienen als Versteck- und Ablegeräume. Die begatteten Weibchen legen mehrere Gelege mit je 20 - 50 Eiern. Nach etwa 14 Tagen schlüpfen die Larven, die sich von Weizenkleie und zugefüttertem Obst und Gemüse ernähren. Nach etwa 10 - 12 Häutungen, die innerhalb von 4 - 5 Monaten erfolgen, sind die Larven etwa 4 - 5 cm groß und bereit, sich zu verpuppen. Zu diesem Zeitpunkt besitzen sie schwarz gefärbte kaudale Abdominalsegmente und wandern auf der Suche nach einem isolierten Ort auf dem Substrat umher. Wenn die wandernden Larven in Plastikschräbchen mit etwas Substrat umgesetzt werden, leiten die Tiere die Verpuppung ein. Dabei verharren sie zusammengerollt und bewegungslos, bis nach 9 - 11 Tagen die etwa 2 - 2,5 cm große Puppe aus der Larvenkutikula schlüpft. Das Puppenstadium dauert je nach Temperatur weitere 9 - 12 Tage bis zum Schlüpfen des adulten

Tieres, das etwas kleiner ist als die Puppe. Wenn die Kutikula ausgehärtet und melanisiert ist, werden die Käfer für die Zucht in einer Kunststoffbox zusammengesetzt.

Während des gesamten Entwicklungszyklus wurden die Tiere bei einer Temperatur von 27,5 °C bis 29,5 °C, einer relativen Luftfeuchte von 30 % und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16 zu acht Stunden gehalten. Adulti und Larven wurden *ad libitum* mit Weizenkleie und mehrmals wöchentlich mit Obst und Gemüse gefüttert. Eine Versorgung mit Wasser war nicht notwendig, da diese Art ihren Wasserbedarf vollständig durch metabolisches und resorbiertes Wasser deckt.

Die zur Messung verwandten Tiere wurden mit fortlaufenden Nummern auf den Schalendekeln eindeutig gekennzeichnet. Vereinzelnungs-, Verpuppungs- und Schlupfdatum wurden registriert. Für eine Altersangabe der Versuchstiere dienten die seit der Verpuppung vergangenen Tage. Der Verpuppungstag galt als Tag 0. Die Dauer des Puppenstadiums unterlag geringen jahresperiodischen Schwankungen und wurde durch Kontrolltiere ermittelt, die derselben Generation angehörten, aus der die Versuchstiere stammten. Das Alter der Puppen wurde in Prozent der durchschnittlichen Entwicklungszeit der Kontrolltiere angegeben. Die Verpuppung wurde dabei als 0 %, die Imaginalhäutung als 100 % der Entwicklungsdauer definiert.

Das Geschlecht der Puppen wurde mit Hilfe einer Vorlage von KONOK (1955 [L103]) anhand der ventralen Fortsätze am kaudalen Abdominalsegment bestimmt (Abb. 2.2).

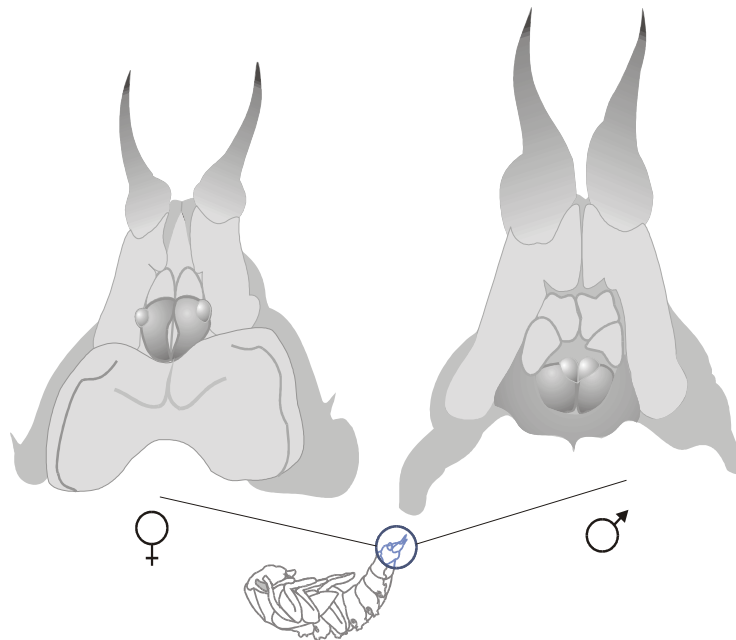


Abbildung 2.2 Geschlechtsbestimmung am Schwarzkäfer *Zophobas rugipes* anhand der ventralen Sternausstülpungen am Abdomen. Weibchen besitzen Ausstülpungen, die wesentlich größer sind als die der Männchen und deren Spitzen nach außen gerichtet sind.

Da diese Vorlage für die nahverwandte Art *Tenebrio molitor* galt, wurde die Bestimmungsmethode für *Zophobas rugipes* verifiziert. Zur Verifizierung wurde das Geschlecht einiger Puppen (4 Männchen und 5 Weibchen) nach oben beschriebener Methode bestimmt. Die geschlüpften Käfer wurden abgetötet und die Genitalien freipräpariert. Die Geschlechtsbestimmung anhand der äußeren Morphologie wurde durch die anatomischen Befunde bestätigt.

Vorbereitung der Puppen. Die Puppen wurden in ihren Vereinzelungsgefäßen vom Zucht-raum zum Labor transportiert. Eine Berührung der Puppen mit den Fingern verursachte heftige Abwehrbewegungen des Abdomens. Aus diesem Grund wurden die Versuchstiere zum Wiegen und zum Einsetzen in die Versuchskammern nur mit Pinzetten und Laborlöffeln transportiert. Vor allen Eingriffen wurden die Tiere für 30 Minuten im Kühlschrank bei 5 - 6 °C abgekühlt, um den Stoffwechsel zu erniedrigen und die Tiere ruhig zu stellen. Die Versuchstiere wurden vor und - wenn noch möglich - nach den Versuchen auf 1 mg genau mit einer Mikrofeinwaage [G18] gewogen.

2.2 Probengewinnung

Herstellung von Homogenaten. Homogenate von *Zophobas* wurden bei verschiedenen Versuchsserien benötigt: zur Analyse von Ionen, Proteinen und Aminosäuren, zur Messung des Kohlendioxidgehalts und zur Messung des Säure-Basen-Status *in vitro*.

Zur Herstellung eines Homogenats wurden die Puppen zwischen den Backen einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Zange gepresst, damit schockgefroren und in ein Thermos-Gefäß mit flüssigem Stickstoff getaucht. Durch Einfrieren bei -196 °C in weniger als einer Sekunde wurden weitere chemische Reaktionen unterbunden. Zur Zerkleinerung des Gewebes wurde das gefrorene Tier in einen vorgekühlten und mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser überführt und dort mit einem ebenfalls vorgekühlten Pistill sorgfältig zerkleinert. Das erhaltene Gewebepulver wurde in ein mit flüssigem Stickstoff gefülltes, gewogenes Kryogefäß [M8] überführt. Dieses wurde verschlossen und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Entnahme von Hämolympfproben. Die Puppe wurde auf einem Objektträger mit Abformmasse auf Silikonbasis [M12] fixiert. Mit einer Insektenpräpariernadel [M7] wurden die Femuren oder Tibien punktiert (Abb. 2.3). Meist trat sofort nach der Punktion oder der Sektion ein Tropfen Hämolymphe aus. Reichte das gewonnene Hämolympfvolumen nicht aus, wurden die Tarsenspitzen abgeschnitten (Abb. 2.3). In manchen Fällen wurde die Blutung durch leichten Druck auf die bewegliche Abdomenspitze beschleunigt.

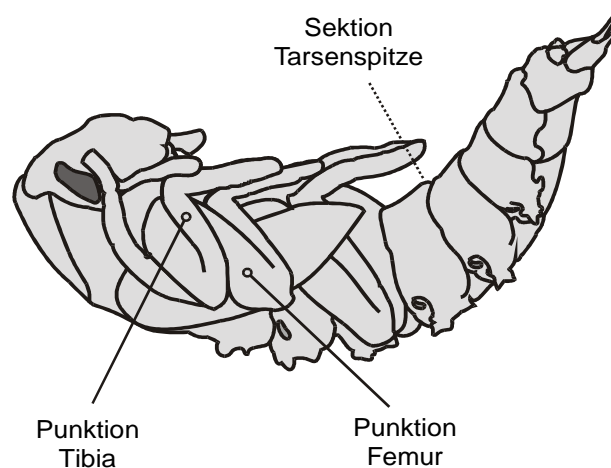


Abbildung 2.3 Punktions- und Sektionsstellen zur Entnahme von Hämolympfproben bei Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die Probennahme erfolgte beidseitig.

Vom sechsten Tag des Puppenstadiums an ist unter der transparenten Puppenkutikula die Bildung der neuen Kutikula des Käfers zu beobachten. Der Zwischenraum füllt sich mit klarer Exuvialflüssigkeit. Dieser Prozess beginnt sichtbar zuerst an den Beinen. Um eine Durchmischung von Hämolymphe und Exuvialflüssigkeit bei der Probennahme zu vermeiden, wurde bei diesen Puppen die Tarsenspitzen der Puppenhülle abgeschnitten und die austretende Exuvialflüssigkeit aufgefangen. Danach wurde die Puppenkutikula der Beine mit einer feinen Pinzette entfernt und die Hämolymphe - wie oben beschrieben - entnommen.

Die austretende Hämolymphe wurde sofort mit einer Hämatokritmikrokapillare [M5] oder mit einer volumengeeichten Präzisionsmikropipette [M10] aufgenommen. Das Hämolymphevolumen in den Mikropipetten konnte durch Ablesen des Meniskus auf einer Schablone auf 0,1 μl genau bestimmt werden (Abb. 2.4).

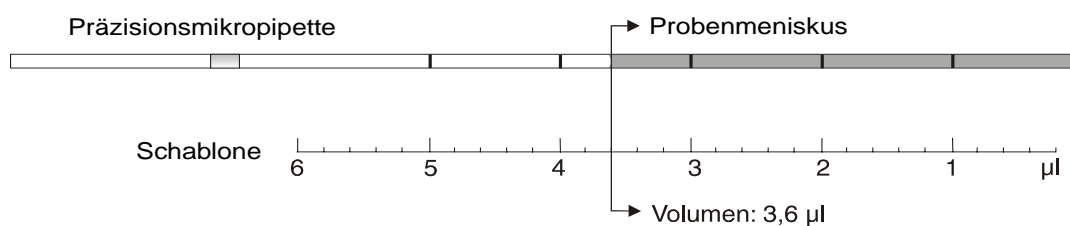


Abbildung 2.4 Schablone zum Abmessen des aufgenommenen Probenvolumens. Verwendet wurden Präzisionsmikropipetten [M10] mit μl -Skalierung, die an die Schablone mit feinerer Skalierung angelegt wurden. Die Position des Meniskus wurde angezeichnet und das entsprechende Volumen berechnet.

2.3 Volumen- und Gewichtsanalyse

Trockengewicht und Wassergehalt. Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden Reaktionsgefäße [M11] mit einer Mikrofeinwaage gewogen. In je einem Gefäß wurde eine Puppe mit Skalpell und Schere zerkleinert. Anschließend wurde das Gewicht auf 1 mg genau bestimmt.

In einem Trockenschrank [G26] wurden die Proben bei 60 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Frischgewicht errechnete sich aus der Differenz zwischen Gewicht vor dem Trocknen und Gewicht des Reaktionsgefäßes. Das Trockengewicht ergab sich aus der Differenz zwischen Gewicht nach dem Trocknen und Gewicht des Reaktionsgefäßes. Das Gewicht des Wassers im Tier wurde aus der Differenz von Frisch- und Trockengewicht berechnet. Der Wassergehalt in Prozent ergab sich aus dem Quotienten von Wasser- und Frischgewicht.

Trockengewicht und Wassergehalt der Hämolymphe wurden durch Trocknung von Hämolympheproben in Mikrokapillaren bestimmt [M5]. Die Mikrokapillaren wurden bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank vorgetrocknet. Die Hämolymphe wurde den Puppen wie auf Seite 9 beschrieben entnommen und die Kapillaren vollständig befüllt, so dass ein Volumen von exakt 9 μl gewonnen wurde. Die Hämolympheproben in den Kapillaren wurden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Wassergehalt und Trockengewicht wurden analog zur Analyse des Homogenates berechnet.

Bestimmung des Hämolymphevolumens. Zur quantitativen Bestimmung der Rolle der Hämolymphe bei der CO_2 -Speicherung ist das Hämolymphevolumen für Aussagen über die Gesamtmenge des in der Hämolymphe gespeicherten CO_2 von Bedeutung.

Zur Bestimmung des Volumens wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt:

Bei der *Exsanguination* wurden den Tieren nach dem Wiegen die Extremitäten, also Beine, Flügel, Fühler und Mundwerkzeuge abgeschnitten und auf Zellstoff durch leichten Druck von Hämolymphe befreit. Der Körper wurde median von kranial nach kaudal eröffnet und am Gewebe und an der Kutikula anhaftende Hämolymphe abgetupft. Gewebe, Kutikula und Extremitäten wurden in Reaktionsgefäße überführt und gewogen. Das Hämolympfgewicht ergab sich aus der Differenz zwischen Gesamtgewicht und Restgewicht.

Bei der *Dilution* wurde das Volumen durch Injektion und Verdünnung des fluoreszierenden Farbstoffes Oregon Green® [Ch13] bestimmt. 1,5 bis 3,0 µl Farbstoff wurden je nach Gewicht der Puppen mit Hilfe einer Mikroliterspritze [G19] in die Mitte des Pronotums injiziert. Hier befindet sich das Herz der Tiere, so dass der Farbstoff sich durch die Pumpbewegungen gut in der Hämolymphe verteilt. Die Injektion des Farbstoffs erfolgte mindestens 24 Stunden vor der Probenentnahme, um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten. In Vorversuchen wurde der Farbstoff 15 Puppen aus unterschiedlichen Entwicklungsstufen injiziert und deren Entwicklung bis zum Käfer beobachtet. Alle Tiere entwickelten sich ohne erkennbare Störungen und waren voll fortpflanzungsfähig.

Für die Messung wurde den Puppen eine Hämolympfprobe entnommen und in eine Hämatokritkapillare überführt. Damit der Verdünnungsfaktor der Probe bestimmt werden konnte, wurden aus der Stammlösung des Farbstoffes 100 bis 500 fach verdünnte Standards hergestellt. Diese wurden in die Kapillaren aufgezogen, in denen sich die Probe befand. Ein kleiner Bolus von Paraffinöl zwischen den fluoreszierenden Kompartimenten verhinderte deren Durchmischung. Die Kapillaren wurden an den Enden mit Wachs versiegelt und in den Strahlengang eines Laser Scanning Mikroskops plaziert [G14]. Der Farbstoff wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und seine Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 518 nm gemessen. Durch vergleichende Messung der Fluoreszenz der Standards und der Hämolympfprobe wurde die Verdünnung des Farbstoffes und dadurch das Hämolympfvolumen ermittelt.

2.4 Analyse von Hämolymphe und Homogenat

Die Analyse der Bestandteile erfolgte für jede Altersstufe des Puppenstadiums an vier bis zwölf Versuchstieren. War von einem Versuchstier ausreichend Probenvolumen vorhanden, wurde die Messung wiederholt. Die Ergebnisse jeder Altersstufe wurden zu Mittelwerten mit Standardabweichung zusammengefasst.

Bestimmung der Osmolarität. Um die Menge osmotisch aktiver Substanzen in Hämolymphe und Homogenat zu bestimmen, wurde ein Dampfdruckosmometer verwandt [G21]. Das Osmometer misst die Temperatur des Taupunkts, der von der Konzentration osmotisch aktiver Substanzen in der Probe abhängt. Nach Kalibrieren des Geräts mit Standards [Ch20] erfolgte die Messung von 7 - 9 µl Hämolymphe oder Homogenat.

Analyse anorganischer Kationen. Anorganische Ionen haben einen wesentlichen Anteil an der Osmolarität von Körperflüssigkeiten. Ihre Konzentration beeinflusst zudem das Lösungsverhalten von Gasen. Aus der Verteilung der Ionen zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten der Versuchstiere lassen sich Aussagen über Membranpotentiale und osmotische Gradienten treffen. In tierischen Geweben finden sich folgende Kationen in größerer Konzen-

tration: Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium. Diese vier Elemente wurden durch Atomabsorptionsspektrometrie mit Hilfe eines Flammen-Atomisierers (F-AAS [G6]) bestimmt. Um Konzentrationen zu erhalten, die im linearen Messbereich des Spektrometers lagen, wurden die Proben je nach Element spezifisch mit Hilfe eines Spritzendilutors [G3] verdünnt. Der Verdünnungslösung wurden Additive zugegeben, die chemische Interferenz bzw. Ionisationsinterferenz verhindern sollten [L184]. Die Analyseparameter sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Element	Wellenlänge (nm)	Spaltbreite (nm)	Lampenstrom (mA)	Gasfluss (l min ⁻¹) Ac / Luft	linearer Messbereich (mg l ⁻¹)	Additive	Verdünnungsfaktor
Natrium	589	0,2	10	1,5 / 8,0	0 .. 0,8	CsCl [Ch7]	600-5000
Kalium	766,5	0,7	10	1,5 / 8,0	0 .. 2	CsCl	800-4000
Calcium	422,7	0,7	15	2,0 / 8,0	0 .. 5	La ₂ O ₃ [Ch16]	30-70
Magnesium	285,2	0,7	15	2,0 / 10,0	0 .. 0,5	La ₂ O ₃	6000-9000

Tabelle 2.1 Einstellungen des F-AAS zur Messung von Kationen. Der Gasfluss setzt sich zusammen aus Acetylen (Ac) und Luft. CsCl verhindert Ionisationsinterferenzen, La₂O₃ verhindert chemische Interferenzen der untersuchten Atome [L184].

Von jeder Versuchstierprobe wurden je nach vorhandenem Volumen drei bis fünf mal 50 µl durch einen automatischen Probengeber in die Zerstäuberkammer des F-AAS injiziert. Der kurzzeitige Ausschlag des Absorptionssignals wurde automatisch integriert. Die drei bis fünf Einzelmessungen wurden zu einem Mittelwert pro Versuchstier zusammengefasst. Vor und nach jeder Serie von 10 bis 20 Versuchstierproben erfolgte eine Kalibrierung mit jeweils drei Standards, die den linearen Messbereich umfassten. Aus dem Verdünnungsfaktor, dem molaren Gewicht und der gemessenen Konzentration in mg l⁻¹ konnte die Konzentration des Elements in der jeweiligen Probe in mmol l⁻¹ bestimmt werden.

Chloridbestimmung. Chlorid ist das anorganische Anion, das in Körperflüssigkeiten einen wesentlichen Ladungsanteil der Kationen ausgleicht. Zudem beeinflusst seine Konzentration Membranpotentiale und Löslichkeitseigenschaften von Gasen. Aus diesem Grund erfolgte eine Bestimmung der Chloridkonzentration in verschiedenen Kompartimenten der Versuchstiere während der Puppenentwicklung.

Zur Analyse wurde ein coulometrischer Chloridtitrator [G2] verwandt. Mit Hilfe eines an einer Silberelektrode angelegten Potentials werden automatisch Silberionen in die Lösung abgeschieden. Diese fällen das in der Probe vorhandene Chlorid vollständig zu unlöslichem Silberchlorid. Der Summenstrom während dieser Titration ist nach dem Faradayschen Äquivalent proportional zum Chloridgehalt der Probe. Der Titrationsendpunkt wird durch Messung der Potentialänderung an einem zweiten Elektrodenpaar mit chlorierten Silberelektroden bestimmt.

Da die Hämolymphe in Mikrokapillaren aufgenommen wurde, konnte der Inhalt der Kapillaren direkt in das Reaktionsgefäß injiziert werden. Die erhaltene Konzentration wurde anschließend auf das jeweilige Probenvolumen umgerechnet.

Im Verlauf der Versuchsreihe ergab sich gelegentlich, dass der Chloridgehalt der Probe unter dem Schwellenwert lag, bei dem das Gerät automatisch die Titration startet. In diesem Fall

wurde mit 5 µl einer 200 mM NaCl-Lösung die Titration initiiert und bei der Berechnung der Konzentration der addierte Standard abgezogen.

Analyse freier Aminosäuren. Für die Bewertung der Elektrolytbilanz und der Puffereigenschaften von Hämolymphe und Gewebe der Versuchstiere war die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen erforderlich. Diese Bestimmung erfolgte durch eine Trennung der mit einem Azofarbstoff derivatisierten Aminosäuren durch hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC [G9]) nach CRAILSHEIM & LEONHARD in leicht abgewandelter Form [L37].

1 µl Probe von Hämolymphe oder Homogenat wurde in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl 50 % Acetonitril [Ch3] überführt. Durch das Acetonitril wurden die in der Probe enthaltenen Proteine denaturiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation in einer Tischkühlzentrifuge [G25] bei 8000-facher Erdbeschleunigung sammelte sich am Boden der Reaktionsgefäße das weiße, denaturierte Proteinpräzipitat. Vom klaren Überstand wurden zweimal 50 µl in frische Reaktionsgefäße pipettiert. Zur Trocknung der Proben wurden die Gefäße mit Überstand und die Gefäße mit Präzipitat mit geöffnetem Deckel in einen Laminarluftflussabzug [G13] gestellt. Der Laminarluftflussabzug wurde verwandt, um eine Verunreinigung der Proben mit Schwebstoffen aus der Luft zu vermeiden. Nach dem Trocknen wurden die Reaktionsgefäße mit den abzentrifugierten Proteinen für die Analyse gelagert (siehe Bestimmung des Proteingehalts, Seite 15).

Die Proben mit dem getrockneten Überstand wurden in 20 µl Natriumbikarbonatlösung [Ch19] resuspendiert, um die anschließende Derivatisierungsreaktion im basischen Milieu zu ermöglichen ($[\text{NaHCO}_3] = 10 \text{ mmol l}^{-1}$, $\text{pH} \geq 8$). Die Derivatisierung begann bei 70 °C in einem Wasserbad nach Zugabe von Dimethylaminoazobenzensulfonyl-Chlorid (40 µl, 4 mM DABS-Cl [Ch10]). Während der zwanzigminütigen Reaktionszeit wurden die Gefäße nach der ersten und der vierten Minute geschüttelt, um eine vollständige Umsetzung der Aminosäuren zu gewährleisten. Bei Anwesenheit von Aminosäuren begann unmittelbar nach der Zugabe des DABS-Cl die Reaktion mit den Aminogruppen der Aminosäuren, die an einer Farbänderung der Lösung von rot nach gelb zu erkennen war. Bis zur Messung der Proben wurden die Reaktionsgefäße bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Für die Auftrennung wurden je 10 µl Analysat in den Fluß der HPLC injiziert und durch die spezifischen Eigenschaften der Aminosäuren unterschiedlich lange in der Trennsäule [G10] zurückgehalten. Die relative Konzentration der Aminosäurederivate wurden durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 436 nm analysiert. Zur Trennung der Aminosäuren wurden zwei Fließmittel verwandt:

A: Citrat-Lösung ($10 - 14 \text{ mmol l}^{-1}$, $\text{pH} 6,4$, [Ch8]) mit 4 % Dimethylformamid [Ch11].

B: Acetonitril mit 30 % Citrat-Lösung und 4 % Dimethylformamid.

Die Flußrate durch die Säule betrug $1,2 \text{ ml min}^{-1}$. Die Trennung der Aminosäurederivate wurde durch einen Fließmittelgradienten ermöglicht (Tabelle 2.2). Der Trennungsvorgang war nach 37 min beendet. Anschließend wurde die Säule für die nächste Analyse rekonditioniert.

Zeit (min)	0	20,3	24,4	27,38	28,56	36,92	37,92	47
Fließmittel B (%)	30	56	86	86	100	100	30	30

Tabelle 2.2 Zeit-Gradienten-Profil von Fließmittel B zur Trennung von Aminosäuren mit der HPLC. Der Gradient zwischen den Zeitmarken verläuft linear. Nach 37 Minuten ist die Trennung beendet, die letzten 10 Minuten dienen zur Rekonditionierung der Säule für den nächsten Lauf.

Die Berechnung des Aminosäuregehalts der Proben erfolgte nach Erstellung einer Kalibriergeraden auf der Basis einer Verdünnungsreihe von derivatisierten Aminosäurestandards [Ch5]. Die Retentionszeiten der bestimmten Aminosäuren wurden mit Hilfe von Aminosäureeinzelsstandards [Ch4] zugeordnet.

Berechnung der Nettoladung freier Aminosäuren. Um die Gesamtladung der Aminosäuren zu ermitteln, muss der Ladungszustand der einzelnen Aminosäuren betrachtet werden: Der Ladungszustand ist dabei abhängig vom pH-Wert des Lösungsmittels und den pK-Werten der Seitengruppen. Dabei können die einzelnen Seitengruppen negativ-, positiv- oder ungeladen vorliegen.

Das Prinzip sei an der Aminosäure Histidin erläutert: Wie alle Aminosäuren besitzt Histidin eine α -Amino- und eine Carboxylgruppe (Abb. 2.5 A B). Zusätzlich enthält sie einen Imidazolring (Abb. 2.5 C). Diese Strukturen können Protonen abgeben oder binden und dadurch ihre Ladung verändern. Die Carboxylgruppe des Histidins besitzt einen pK-Wert von 1,8, die α -Aminogruppe einen pK-Wert von 9,2. Im physiologischen pH-Bereich liegt die Aminosäure als Zwitterion in der sogenannten Betainform vor: die Carboxylgruppe ist negativ, die α -Aminogruppe positiv geladen, so dass die Ladung insgesamt ausgeglichen ist.

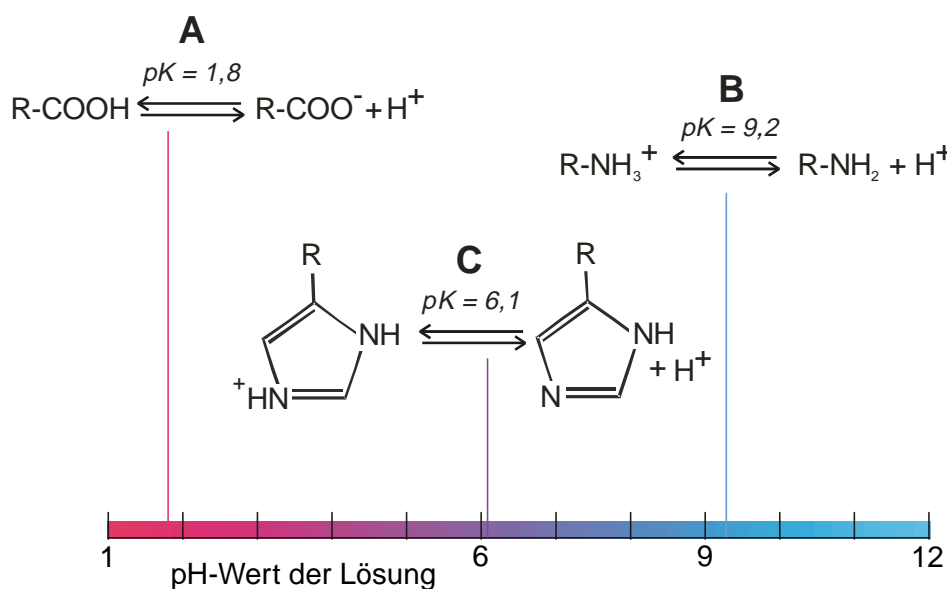


Abbildung 2.5 Funktionelle Gruppen der Aminosäure Histidin und deren Protonierungsreaktionen. Die Konzentrationen beider Seiten sind gleich, wenn der pH-Wert dem pK-Wert entspricht. Bei niedrigerem pH-Wert liegt das Reaktionsgleichgewicht auf der linken, bei höherem pH-Wert auf der rechten Seite der Gleichung (pK-Werte aus [L181]).

Entscheidend für die Gesamtladung des Histidins ist die Aminogruppe im Imidazolring mit einem pK-Wert von 6,1. Je mehr der pH-Wert im Medium über 6,1 ansteigt, desto geringer wird der Anteil an positiv geladenen Imidazolaminogruppen. Der Anteil der geladenen Gruppen an der Gesamtladung kann, ausgehend von der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung, für bestimmte pH-Werte berechnet werden (siehe Gleichung 3 auf Seite 4).

Ist die deprotonierte Form geladen (X^-), errechnet sich der Anteil F_{X^-} folgendermaßen:

$$F_{X^-} = \frac{10^{(pH-pK)}}{1 + 10^{(pH-pK)}} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Ist die protonierte Form geladen (HX^+ , z.B. Histidin), dann gilt für die Fraktion F_{HX^+}

$$F_{HX^+} = \frac{1}{1 + 10^{(pH-pK)}} \quad (\text{Gleichung 6})$$

Wenn man diese Berechnung für alle funktionellen Gruppen einer Aminosäure durchführt und die Fraktionen addiert, erhält man für jede Aminosäure einen Ladungsanteil, dessen Vorzeichen abhängig ist von der Art der Ladung. In Abb. 2.6 sind die Ladung und deren Fraktion für die untersuchten Aminosäuren für einen pH-Wert von 7,0 dargestellt.

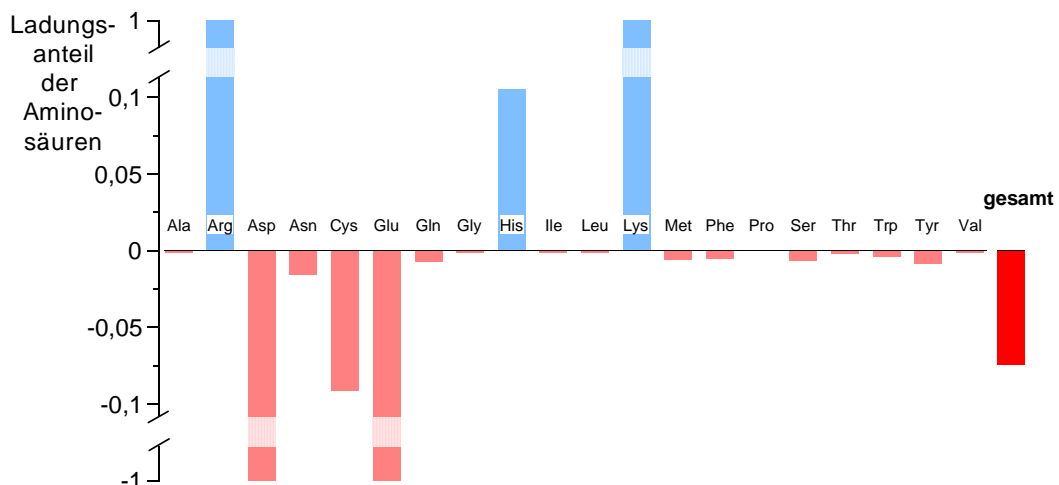


Abbildung 2.6 Anteil der Ladung an der Konzentration der untersuchten proteinogenen Aminosäuren bei einem pH-Wert von 7,0. Negative Ladungen werden als Balken unterhalb der Abszisse, positive Ladungen oberhalb der Abszisse dargestellt. Die Ordinate ist unterbrochen, um die geringen Ladungsanteile einiger Aminosäuren zu erkennen.

Multipliziert man die Ladungsfractionen mit der Konzentration der jeweiligen Aminosäure, kann daraus die Nettoladung berechnet werden. Wenn alle Aminosäuren in gleicher Konzentration vorliegen, ergibt sich bei einem pH-Wert von 7,0 eine negative Gesamtladung, die etwa 7,5 % der Gesamtkonzentration an Aminosäuren beträgt (Abb. 2.6 „gesamt“).

Proteinkonzentrationsbestimmung. Im physiologischen pH-Bereich sind Proteine negativ geladen [L101]. Sie tragen zum Ausgleich der positiven Ladungen in den Körperflüssigkeiten bei. Auch die Löslichkeit von Gasen wird durch Proteine beeinflusst. Zur Quantifizierung solcher Einflüsse wurde der Proteingehalt im Gewebe und in der Hämolymphe von *Zophobas* unter Anwendung der Methode nach LOWRY bestimmt [L122]. Für die Erfordernisse dieser Arbeit wurde die Methode leicht abgewandelt.

Als Proben wurden die aus der Aminosäurebestimmung stammenden getrockneten Proteinpräzipitate verwandt. Diese wurden mit 200 µl destilliertem Wasser und 200 µl LOWRY Reagenz [Ch17] aufgenommen und im Ultraschallbad resuspendiert. Nach 30 Minuten wurde 200 µl FOLIN-CIOCALTEU-Phenol-Reagenz [Ch14] zugegeben und die Proben gut durchmischt. Durch Reaktion des gelben Reagenzes mit den Proteinen ergibt sich ein Farbumschlag nach Blau. Nach weiteren 30 Minuten wurde das Gemisch mit 400 µl destilliertem Wasser verdünnt und die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 750 nm in einem Diodenarrayphotometer [G4] bestimmt. Die Berechnung des Proteingehalts erfolgte mit Hilfe einer Kalibriergeraden, die mit einer Verdünnungsreihe von bovinem Serum-Albumin (BSA [Ch6]) hergestellt wurde.

2.5 Berechnung der Konzentration untersuchter Substanzen im Gewebswasser

Da der wässrige Überstand des zentrifugierten Homogenats ein Gemisch aus Hämolymphe- und Gewebswasser darstellt, können aus den gemessenen Werten für Homogenat und Hämolymphe die Konzentrationen der untersuchten Substanzen im Gewebswasser berechnet werden:

$$C_{\text{Gewebswasser}} = \frac{C_{\text{Homogenat}} - (F_{\text{HLWasser}} \cdot C_{\text{HL}})}{F_{\text{Gewebswasser}}} \quad (\text{Gleichung 7})$$

F_K ist dabei der fraktionelle Wasseranteil des jeweiligen Kompartiments K (Gewebe oder Hämolymphe HL) bezogen auf den fraktionellen Gesamtwassergehalt der Puppe. C_K ist die Konzentration im jeweiligen Kompartiment.

Für eine Fehlerabschätzung wurden Minimal- und Maximalwerte mittels Fehlerfortpflanzung berechnet. Dafür wurden jeweils obere und untere Grenzwerte in Gleichung 7 eingesetzt, die durch Addition oder Subtraktion der Standardabweichungen von den Mittelwerten der gemessenen Parameter bestimmt wurden ([L153] S. 23 f).

2.6 Analyse des Kohlendioxidstoffwechsels und korrelierter Variablen

Die Messung von Kohlendioxid erfolgte mit Hilfe eines Ultrarotabsorptionsspektrometers (URAS [G27]). Ein konstanter Luftstrom ([G15][G17]) wurde zunächst mithilfe einer hochkonzentrierten NaOH-Lösung von atmosphärischem CO_2 befreit. Anschließend wurde die Luft angefeuchtet und thermostatisiert [G5][G24]. Nach Durchströmen der Referenzkammer wurde die Luft durch die Versuchskammer geleitet. Das abgegebene Kohlendioxid wurde durch den Luftstrom zur Messkammer des URAS transportiert. Entsprechend dem Gehalt von CO_2 wurde ein Teil der applizierten Infrarotstrahlung absorbiert. Durch Differenzmessung der Absorption zwischen Mess- und Referenzkammer konnte vom Versuchstier abgegebenes CO_2 in Konzentrationen von wenigen ppm bestimmt werden. Aus diesen Konzentrationen konnte bei bekanntem Volumenstrom und bekannter Signalcharakteristik die Rate abgegebenen Kohlendioxids als Stoffmengenfluss (nmol min^{-1}) oder als absolute Stoffmenge (nmol) erfasst werden.

Messung von CO_2 -Abgaberate und Abgabemuster. Zur Messung der CO_2 -Abgabe der untersuchten Puppen wurden folgende konstante Messbedingungen gewählt: Messbereich des URAS 0 bis 100 ppm, Gasfluss durch das System 100 ml min^{-1} [G17], Messtemperatur

15 ± 1 °C, relative Luftfeuchtigkeit 76 % bei einem Wasserdampfpartialdruck von 9,9 Torr (1,3 kPa). Die hohe Luftfeuchtigkeit wurde eingestellt, um den respiratorischen Wasserverlust der Puppen zu minimieren und den Wassergehalt während der Langzeitmessungen nicht durch diffusive oder konvektive Wasserabgabe zu beeinflussen. Die Tiere wurden vor dem Einsetzen ins Versuchsgefäß gewogen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Abgaberate auf das Körpergewicht der Versuchstiere bezogen ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$). Um eine eventuelle Nullpunktdrift korrigieren zu können, wurde vor und nach jeder Messung das URAS-Signal ohne Versuchstier aufgezeichnet.

Bestimmung des CO_2 -Gehalts. Der CO_2 -Gehalt von Homogenat oder Hämolymphe wurde infrarotoptisch gemessen [G27]. Dazu wurde nach Hetz eine spezielle Extraktionskammer konstruiert, die aus Acrylglas bestand und in ihrem Boden über eine Fassung für AAS-Probengefäße [M1] verfügte (Abb. 2.7). Durch ein im Deckel der Kammer befindliches Septum wurden Proben injiziert. Über eine Stahlkanüle wurde dem Probengefäß mit einer peristaltischen Pumpe [G23] kontinuierlich CO_2 -freie Säure (0,2 - 0,4 M H_2SO_4) zugeführt.

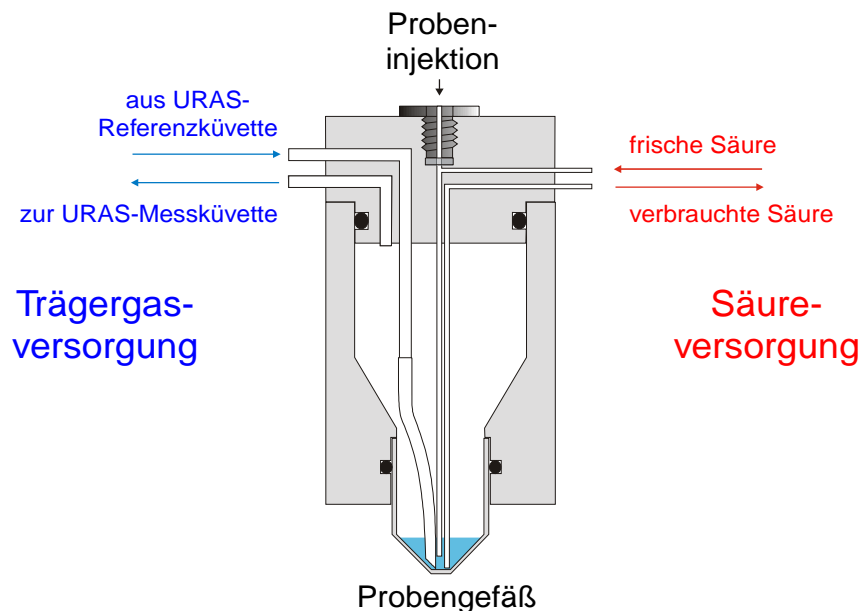


Abbildung 2.7 Extraktionskammer zur Bestimmung des Kohlendioxidgehalts aus Proben *in vitro*. Die Schnittzeichnung verdeutlicht den Weg des Trärgases (links) und der Säure (rechts). Deckel und Probengefäß sind gegen die Extraktionskammer mit Dichtungsringen gasdicht abgeschlossen.

Durch die Ansäuerung wurde in der Probe chemisch gebundenes Kohlendioxid in die physikalisch gelöste Form überführt. Stickstoff als Trärgas wurde durch einen Silikonschlauch bis zum Boden des Probengefäßes geführt, sprudelte durch die Probe und wusch das gesamte CO_2 aus. Die Strömungsgeschwindigkeit des Stickstoffs betrug 100 ml min^{-1} . Das Trärgas führte das CO_2 aus der Probe durch eine Bohrung im Deckel der Extraktionskammer über Schläuche zur Messküvette des URAS. Dort resultierte die Infrarotabsorption des Kohlendioxids in einem kurzzeitigen Ausschlag (Peak) des Mess-Signals. Das Integral dieses Peaks war proportional zur applizierten Menge an CO_2 . Nach beendeter Messung wurde das verbrauchte Proben-Säure-Gemisch durch eine weitere Stahlkanüle entfernt. Der Messbereich des URAS betrug 0 - 200 ppm.

Eine direkte Kalibrierung der Anordnung erfolgte durch den Einsatz von Standards (1 - 10 μl [G19]) von Natriumbikarbonatlösungen mit Konzentrationen von 2,5 bis 20 mmol l^{-1} vor und nach jeder Messreihe. Das destillierte Wasser wurde vor der Herstellung mit Stickstoff gesättigt und anschließend durch Unterdruckfiltration steril filtriert und entgast. Natriumbikarbonat wurde vor der Herstellung für mehrere Tage bei Raumtemperatur im Exsikkator über Silikagel getrocknet [M13].

Um die CO_2 -Kapazität von Homogenaten und Hämolympfproben zu ermitteln, wurde der CO_2 -Gehalt in Abhängigkeit vom P_{CO_2} gemessen. Wegen des großen benötigten Probenvolumens wurden die Hämolympfproben mehrerer gleichaltriger Puppen kombiniert. Alle Proben wurden mit etwa zwei Gewichtsäquivalenten destillierten Wassers [G30] aufgefüllt. Das Gewicht des zugegebenen Wassers wurde durch erneutes Wiegen quantifiziert. Die Proben wurden gut durchmischt [G29] und bei 2 °C in einer Kühlzentrifuge [G12] bei maximaler Umdrehung (18000 U min^{-1}) zentrifugiert, um Zellen zu entfernen. Der wässrige Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Der Transport und die Lagerung der Proben erfolgte in flüssigem Stickstoff. Die Proben wurden spätestens zwei Stunden nach der Herstellung des Homogenats verwertet.

Zur Titration wurde für jeden für die Äquilibration vorgesehenen CO_2 -Partialdruck ein Aliquot von 200 μl Überstand entnommen und in HPLC-Probengefäße [M6] mit Schraubdeckel, Dichtung und Septum pipettiert. Die Gefäße wurden im Wasserbad bei 15 °C thermostatisiert. Über das Septum wurden zwei kurze Stahlkanülen appliziert. Eine Kanüle reichte bis knapp über den Probenspiegel. Sie diente der Zufuhr des Äquilibriumsgases. Über die andere Kanüle wurde das Gefäß entlüftet und Proben entnommen. Das Äquilibriumsgas wurde mit Hilfe einer Gasmischpumpe [G7] aus Stickstoff und CO_2 hergestellt. Um Wasserverluste zu vermeiden, wurde das Gasgemisch bei 15 °C mit Wasserdampf gesättigt, bevor es in das Titrationsgefäß geleitet wurde. Nach einer Äquilibrationszeit von 20 min wurden drei bis fünf mal Proben mit einem Volumen von 5 bis 20 μl mit einer Mikroliterspritze entnommen und in die Extraktionskammer injiziert, um den CO_2 -Gehalt zu bestimmen (siehe Seite 17). Um eine Verfälschung mit Luft aus der Spritze zu vermeiden, wurde die Mikroliterspritze vor der Probenentnahme mit dem Äquilibriumsgas gespült.

Die Konzentration des Kohlendioxids in der Probe $C_{\text{CO}_2(\text{Probe})}$ wurde analog zu BRIDGES & SCHEID [L18] aus der Gesamtkonzentration und den Anteilen von Homogenat oder Hämolymphe F_{Probe} und dem zugegebenen Wasser $F_{\text{H}_2\text{O}}$ berechnet:

$$C_{\text{CO}_2(\text{Probe})} = \frac{C_{\text{CO}_2(\text{gesamt})} - \beta_{\text{CO}_2(\text{H}_2\text{O})} \cdot P_{\text{CO}_2}}{F_{\text{Probe}}} \quad (\text{Gleichung 8})$$

Wobei $\beta_{\text{CO}_2(\text{H}_2\text{O})} \cdot P_{\text{CO}_2}$ formal $F_{\text{H}_2\text{O}} \cdot C_{\text{CO}_2(\text{H}_2\text{O})}$ entspricht.

CO₂-Kapazitätskoeffizienten. Nach DEJOURS [L39] wird die Konzentrationsänderung eines Gases pro Änderung des Partialdrucks des Gases als Kapazitätskoeffizient (englisch: capacitance coefficient) β definiert:

$$\beta_{CO_2} = \frac{\Delta C_{CO_2}}{\Delta P_{CO_2}} \quad (\text{Gleichung 9})$$

β beschreibt die Menge eines Gases, die sich bei definierten Partialdrucken physikalisch und chemisch in einem definierten Volumen einer Flüssigkeit oder eines weiteren Gases löst. Mathematisch ist der Kapazitätskoeffizient die Steigung der Kohlendioxidkonzentration in Abhängigkeit vom Partialdruck. Nachdem wie oben beschrieben für Hämolymphe und Homogenat eine CO₂-Gehaltskurve erstellt wurde, konnte durch Differentiation der Ausgleichsfunktion der Kapazitätskoeffizient ermittelt werden.

Physikalischer Löslichkeitskoeffizient und pK-Wert. Um den Einfluss von Kohlendioxid auf den Säure-Basen-Status der Puppen untersuchen zu können, wurde die Henderson-Hasselbalch-Gleichung zur Berechnung des pH-Werts bzw. der Bikarbonatkonzentration verwandt (Gleichung 3 auf Seite 4).

In der Gleichung sind mit dem physikalischen Löslichkeitskoeffizienten α und dem pK-Wert für Kohlendioxid zwei Parameter angegeben, die experimentell nur schwer zu bestimmen sind. Bei HEISLER ([L76], S. 13f) finden sich zwei empirisch bestimmte Gleichungen, mit denen diese beiden Größen berechnet werden können. Dabei ist α abhängig von der Temperatur und der Molarität der Lösung. Der pK-Wert wird beeinflusst durch die Temperatur, die Ionenstärke, den pH-Wert, die Natrium- und die Proteinkonzentration der Lösung (vgl. Einleitung auf Seite 4). Da alle Einfluss nehmenden Parameter während dieser Arbeit entweder gemessen oder vorgegeben wurden, konnten der physikalische Löslichkeitskoeffizient und der pK-Wert für alle Altersstufen der Puppen und alle Kompartimente berechnet werden.

Nichtbikarbonatpufferwert. Um Aussagen über die Speicherfähigkeit für CO₂ und die Pufferfähigkeit für entstehende Protonen treffen zu können, wurde der Pufferwert der Nichtbikarbonatpuffer bestimmt. Er gibt an, um welchen Wert die Bikarbonatkonzentration eines Kompartimentes steigt, wenn der pH-Wert des Kompartiments um eine Einheit sinkt [L76]. Für die Bestimmung des Pufferwerts wurde ein pH-Bikarbonat-Diagramm erstellt. Die Wertepaare wurden mit Hilfe der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung ermittelt:

$$[HCO_3^-] = C_{CO_2} - (\alpha \cdot P_{CO_2}) \quad (\text{Gleichung 10})$$

$$pH = pK + \log \left(\frac{C_{CO_2}}{\alpha \cdot P_{CO_2}} - 1 \right) \quad (\text{Gleichung 11})$$

Für die erhaltenen Wertepaare wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Der Pufferwert wurde als Steigung der Regressionsgeraden abgelesen.

Messung des HämolympH-pH-Werts *in vivo*. Für die Messung des pH-Werts *in vivo* wurden Miniatur-Glas-pH-Elektroden nach HETZ hergestellt und modifiziert [L81][L83]:

Die pH-Elektroden bestanden aus einer Bleigaskapillare als Schaft [M3], in die eine Spitze aus pH-empfindlichem Glas [M9] eingeschmolzen wurde. Die Spitze wurde anschließend zu einer Kalotte geblasen. Der Durchmesser der Kalotten lag zwischen 200 und 500 μm . Die Glaselektrode wurde in einen Plexiglasschaft eingesetzt, der die Ableitelektrode aus chloriertem Silberdraht [M2] enthält. Elektrode und Schaft wurden luftblasenfrei mit Pufferlösung gefüllt (200 mM KH_2PO_4 [Ch15], 400 mM K_2HPO_4 [Ch9], 1:1) und luftdicht verschlossen.

Die Referenzelektroden bestanden aus einer Borosilikatgaskapillare [M4], deren Spitze mit einem Vertikalpuller [G28] gezogen wurde. Die Kapillarspitze wurden mit einer Lösung aus 0,9 % NaCl gefüllt, die durch Zugabe von 2 % Agar [Ch1] immobilisiert wurde. Die Referenzelektrode wurde ebenfalls in einen Plexiglasschaft mit Ableitelektrode eingesetzt. Elektrode und Schaft wurden luftblasenfrei mit einer silberchloridhaltigen einmolaren KCl-Lösung aufgefüllt und luftdicht verschlossen.

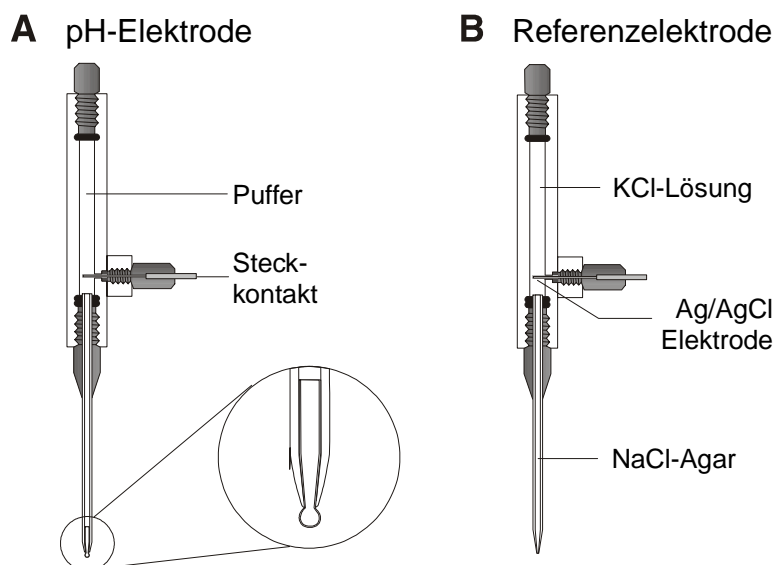


Abbildung 2.8 Schnittzeichnung von pH-Elektrode (A) und Referenzelektrode (B). Die Glasspitzen und die Silber/Silberchlorid-Ableitelektroden sind in einem Schaft aus Plexiglas fixiert. Alle Hohlräume sind mit Lösung gefüllt und luftdicht verschlossen.

Die Elektrodenschäfte wurden an einem Halter montiert, der mit PTFE-Paste [Ch23] präpariert wurde, um die Leitfähigkeit der Halterung zu minimieren und Kriechströme zu vermeiden. Nach der Montage wurden die Elektroden mit einem Methanol haltigen Zellstofftuch gereinigt und der Halter an einem Mikromanipulator [G20] befestigt.

Die Empfindlichkeit der Elektroden gegenüber elektrostatischen Störungen war so groß, dass die Versuche in einem Faradayschen Käfig durchgeführt werden mussten.

Die Impedanz der Glaselektroden betrug 2 - 10 G Ω . Die Elektroden wurden nur dann für Versuche eingesetzt, wenn die Potentialänderung mehr als 54 mV pH^{-1} betrug. Die Kalibrierung der Messkette erfolgte im thermostatisierten Wasserbad (15 ± 1 °C) mit Präzisionspuffern bei drei verschiedenen pH-Werten (7,445, 6,990, 6,063 aus [Ch18] und [Ch15]). Der pH-Wert

der Puffer wurde wöchentlich mit Hilfe einer Radiometer BMS-Apparatur [G1] und NBS-Präzisions-pH-Standards überprüft [Ch21][Ch22].

Für die pH-Messung *in vivo* wurden die Puppen mit dem Rücken nach oben an einer Plexiglasplatte befestigt (Abb. 2.9). Die Befestigung erfolgte mit Silikonabdruckmasse [M12]. Die Platte wurde in die Versuchskammer für die CO₂-Messung eingesetzt. In der Plexiglasplatte befand sich ein Loch, das durch das Pronotum der Puppen verdeckt wurde. Die Kutikula des Pronotums wurde lateral mit einer Präpariernadel [M7] perforiert. Durch diese Perforationen wurden die Elektroden in die Hämolymphe abgesenkt. Die Wunden wurden mit Silikonabdruckmasse abgedichtet und verschlossen. Die Implantation der Elektroden dauerte etwa fünf Minuten.

Nach einer Beruhigungsphase von mindestens zwei Stunden wurde für mindestens acht und durchschnittlich 24 Stunden die CO₂-Abgaberate zusammen mit dem pH-Wert im Tier aufgezeichnet. Während der Messung wurden gleichzeitig die Wassertemperatur im Thermostatisierbecken und die Lufttemperatur über dem Messgefäß aufgezeichnet. Nach Beendigung der Messung wurden die Elektroden aus den Tieren entfernt und die Traumata mit Wachs abgedeckt. Die pH-Messkette wurden nochmals mit Präzisionspuffern kalibriert, um eventuelle Änderungen des Spannungssignals zu erfassen. Nach der Messung wurde die Glaskalotte mit Elektrodenreiniger [Ch12] von anhaftenden Hämolympbestandteilen und Geweberesten befreit. Danach wurde sie für zwei Tage in Puffer für einen erneuten Einsatz vorkonditioniert. Die Spitzen der Referenzelektroden wurden vor jeder Messung neu hergestellt.

HämolympH-pH-Wert *in vivo* bei exogener Hyperkapnie. Um den Einfluss eines erhöhten P_{CO_2} in der Umgebungsluft auf den pH-Wert der Hämolymphe zu bestimmen, wurden mehrere Magnetventile [G16] zur Steuerung des Gasflusses in den Luftweg der Messapparatur integriert. Durch Umschalten der Magnetventile konnte das Versuchstier automatisch verschiedenen CO₂-Partialdrucken ausgesetzt werden.

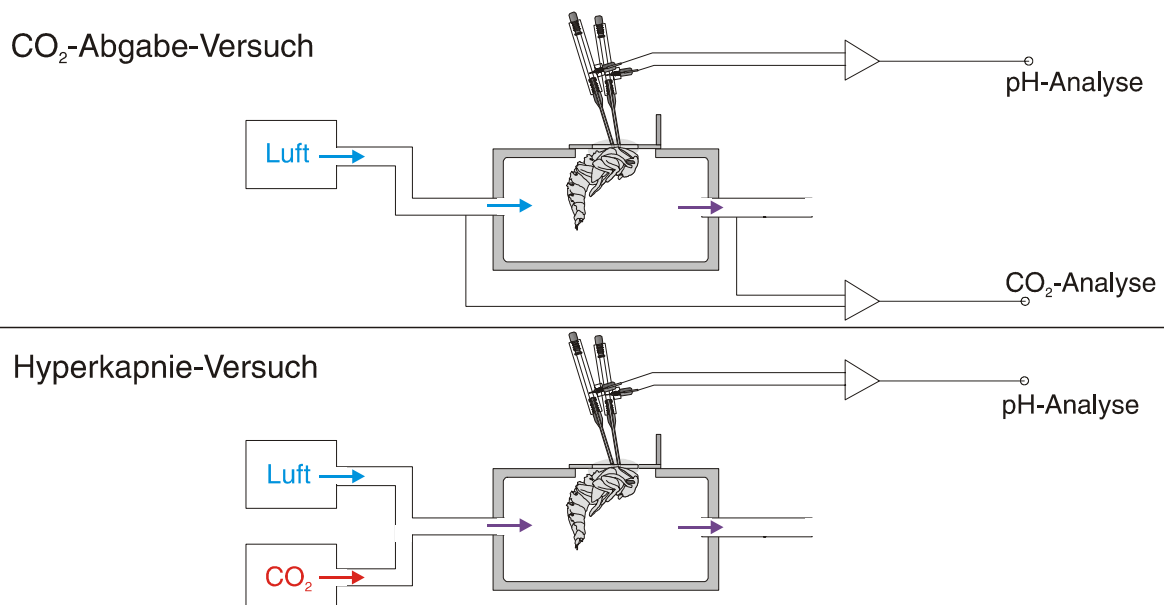


Abbildung 2.9 Versuchsaufbau für CO₂-Analyse und pH-Messung *in vivo* bei Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die CO₂-Analyse erfolgte differentiell zwischen Referenz- und Messkammer eines Ultrarotabsorptionsspektrometers. Luft wurde vor dem Versuch von CO₂ befreit und angefeuchtet.

Durch zwischenzeitliches Umschalten auf Kohlendioxid freie Luft wurden Änderungen der CO_2 -Abgaberate und des pH-Wertes untersucht. Die Einwirkungsdauer der Hyperkapnie betrug eine, drei oder sechs Stunden. Die Pausen bis zur nächsten Hyperkapnie dauerten drei, sechs oder zwölf Stunden, um eine vollständige Erholung zu gewährleisten. Eine detaillierte Übersicht aller Hyperkapnieversuche findet sich in Tabelle 6.17 auf Seite 124. Während hyperkapnischer Bedingungen konnte keine CO_2 -Abgabe gemessen werden, weil der Kohlendioxidgehalt des Gasgemischs den Messbereich des URAS überschritt.

Die an den Massendurchflussreglern [G17] eingestellten CO_2 -Partialdrucke wurden vor Durchführung der Versuchsreihe mit einer in der Versuchskammer integrierten P_{CO_2} -Elektrode [G22] gemessen. Die Elektrode wurde zuvor mit Hilfe einer Gasmischpumpe [G7] kalibriert.

Um Versuchstiere zu betäuben und zu immobilisieren, wurden Insekten in früheren Arbeiten in reinem CO_2 inkubiert. WOBSCHELL nutzte diese Methode auch zur Betäubung der Puppen von *Zophobas*, um Stigmen intubieren zu können [L186]. Um die Wirkung reinen Kohlendioxids auf die Puppen und die anschließende Erholungsphase zu untersuchen, wurden vier Versuchstiere für 40 Minuten in 100 % Kohlendioxid äquilibriert.

2.7 Statistische Auswertung

Alle untersuchten Parameter sind angegeben als Mittelwerte (MW) der Einzelmessungen mit Standardabweichungen (S.A.) bei normalverteilten Ergebnissen oder minimale (min) und maximale (max) Grenzwerte durch Berechnung einer Fehlerfortpflanzung.

Sämtliche statistischen Tests wurden mit dem Freeware-Programm Kyplot 2.0 beta [S4] berechnet. Für den Ergebnisvergleich verschiedener Altersstufen wurde der Vergleichstest nach TUKEY-KRAMER verwandt. Dieser Test führt nach Prüfung der Normalverteilung einen paarweisen Vergleich mehrerer Messreihen durch. Die Signifikanzniveaus wurden bei Irrtumswahrscheinlichkeiten von 5 %, 1 % und 0,1 % festgelegt.

2.8 Signalerfassung und Datenverarbeitung

Für die Umwandlung und Aufbereitung der Messsignale für die digitale Aufzeichnung wurden Messverstärker verwandt, die zum Teil am Max-Planck-Institut in Göttingen und zum Teil am eigenen Lehrstuhl entwickelt und gefertigt wurden. Als Datenerfassungsprogramm diente das Programm Turbolab [S6]. Die Daten wurden mithilfe eigens geschriebener Programme der Programmiersprache PERL [S1] gefiltert und sortiert. Die tabellarische Aufbereitung erfolgte mit dem Programm Excel 98 [S5]. Die grafische Verarbeitung der Messwerte sowie die statistische Auswertung erfolgte mit Kyplot 2.0 beta [S4]. Für Grafiken, die keine Messwerte beinhalten, wurde das Programm CorelDraw 8 [S3] eingesetzt. Die vorliegende Arbeit wurde vollständig mit dem Textverarbeitungsprogramm FrameMaker 5.5 + SGML [S2] verfasst.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung von *Zophobas rugipes*

Über einen Zeitraum von 36 Monaten wurden ca. 3400 Larven vereinzelt. Von diesen entwickelten sich etwa 2600 zu Puppen. Die Zeit von der Vereinzelung bis zur Verpuppung blieb konstant bei $8,6 \pm 0,6$ Tagen. Von den Puppen wurden etwa 850 Tiere für Versuche verwandt. Aus den restlichen etwa 1750 Tieren schlüpfen nach $9,8 \pm 1,8$ Tagen 1430 Käfer, die für die weitere Zucht eingesetzt wurden.

3.2 Gewicht der Versuchstiere

Das Gewicht der Puppen variierte zwischen 0,41 und 0,92 g. Dabei waren die Männchen mit $0,663 \pm 0,080$ g (Anzahl der Versuchstiere: $n = 272$) signifikant schwerer als die Weibchen mit $0,594 \pm 0,055$ g ($n = 184$, $P \leq 0,01$).

3.3 Wassergehalt und Volumen der Kompartimente

Gesamtwassergehalt. Der Wassergehalt der Puppen blieb während der gesamten Entwicklung unverändert (Abb. 3.1 und Tabelle 6.1 auf Seite 110). Er betrug durchschnittlich $58,7 \pm 1,3$ Prozent des Frischgewichts ($n = 68$), unabhängig vom Geschlecht der Versuchstiere.

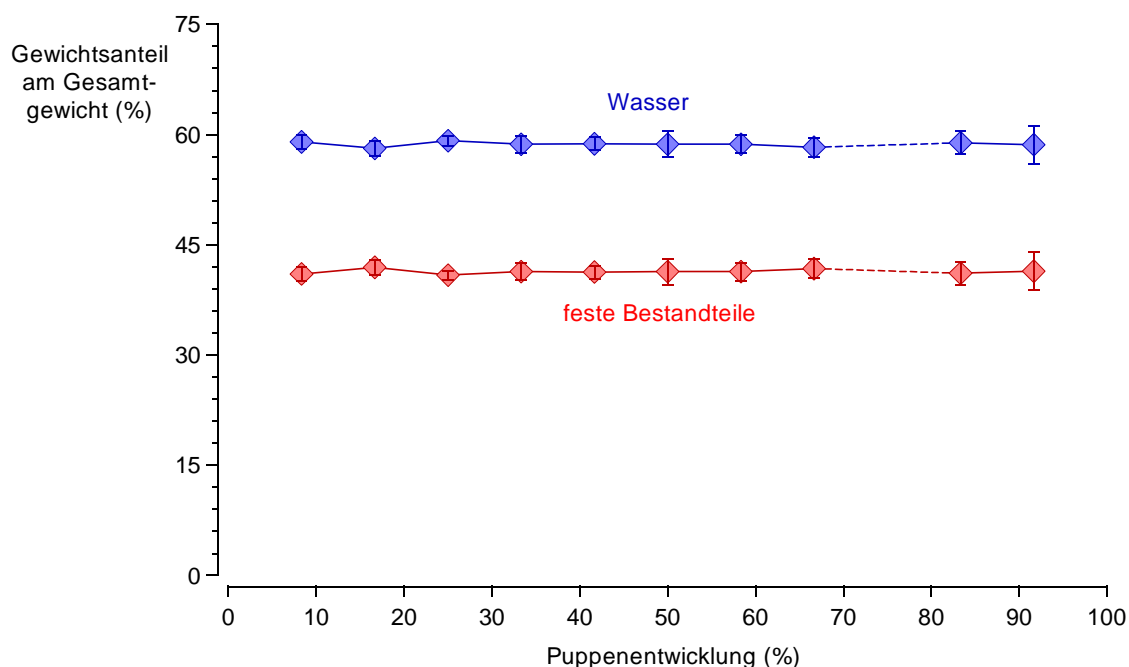


Abbildung 3.1 Prozentualer Anteil von Wasser und festen Bestandteilen am Körpergewicht während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen (Anzahl Versuchstiere pro Altersstufe: $n = 6 - 7$, keine Messung bei 8 Tage alten Puppen. 100 % entspricht 11 Tagen). Da die Dauer des Puppenstadiums während der Versuche zwischen 9 und 11 Tagen variierte, werden alle Altersangaben zur besseren Vergleichbarkeit der Einzelversuche in Prozent der Dauer des Puppenstadiums angegeben.

Volumen und Wassergehalt von Hämolymphe und Gewebe. Die Bestimmung des Hämolympfvolumens mit Hilfe der *Dilution* war nicht erfolgreich. In 90 % der Fälle ergaben sich Hämolympfvolumina, bei denen die Puppen vollständig mit Hämolymphe gefüllt gewesen wären. Auf dieses Problem wird in der Diskussion der Methodik eingegangen (siehe Kapitel 4.2 auf Seite 53).

Als Ergebnis der *Exsanguination* ergab sich ein Anteil des Hämolympfvolumens am Puppengewicht von durchschnittlich 28,8 %.

In der folgenden Abbildung werden jeweils die prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen dargestellt. Die detaillierten Ergebnisse finden sich in Tabelle 6.2 auf Seite 111 und Tabelle 6.3 auf Seite 112 im Anhang.

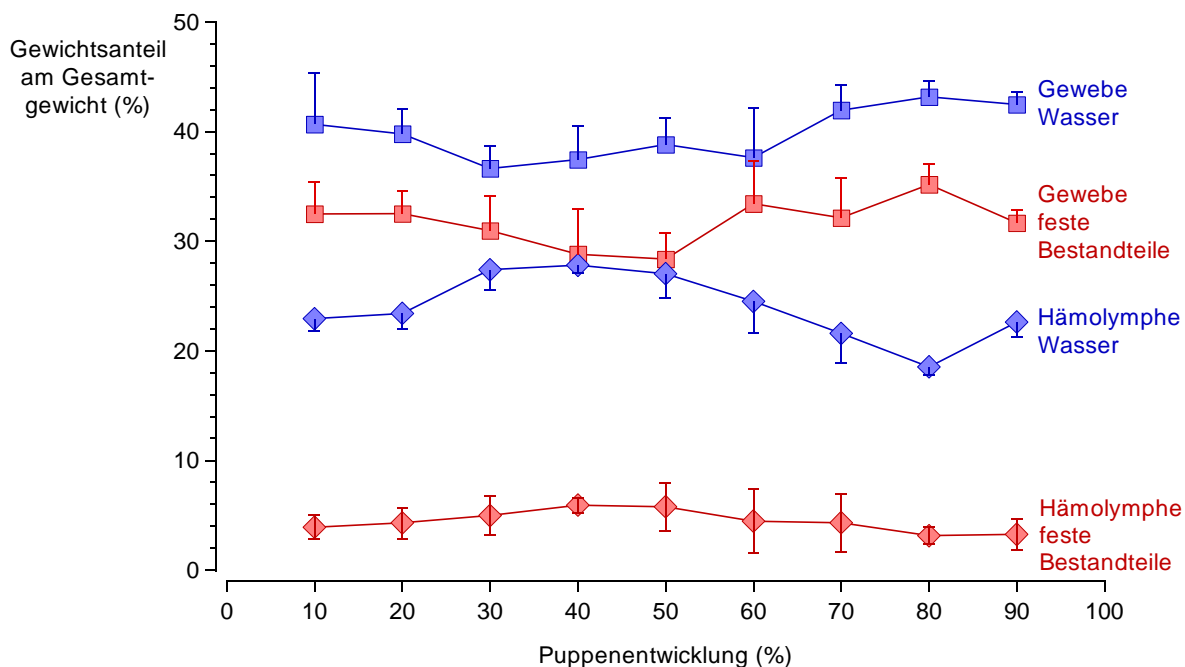


Abbildung 3.2 Anteil von Gewebe und Hämolymphe am Körpergewicht während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 4 - 8$, 100 % = 9 Tage). Beide Kompartimente sind unterteilt in Trockenanteil und Wasseranteil.

Der Anteil an Hämolymphe nahm bis zur Mitte der Puppenentwicklung zu und betrug dann maximal $33,7 \pm 6,9$ % des Gesamtgewichts. Zum Ende hin sank der Hämolympfgehalt auf $21,7 \pm 2,4$ % des Gesamtgewichts. Der Unterschied zwischen diesen beiden Werten war statistisch signifikant ($P \leq 0,05$). Bemerkenswert war, dass der Anteil der Hämolymphe am letzten Tag vor dem Schlüpfen wieder auf $25,9 \pm 3,5$ % anstieg. Die Änderung des Hämolymphteils basierte dabei auf einer proportionalen Änderung des Trocken- und des Wasseranteils der Hämolymphe. Der Anteil fester Gewebebestandteile blieb während der Entwicklung fast unverändert bei 30 %. Es wurde kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Puppen festgestellt.

3.4 Kationengehalt der Hämolymphe

Die Konzentrationen der Kationen änderten sich während der Puppenentwicklung nur geringfügig: Die Änderungen waren statistisch nicht signifikant. Eine Ausnahme stellte Magnesium dar, dessen Konzentration im Laufe der Entwicklung von 83,1 auf 52,0 meq l⁻¹ abnahm. Im letzten Drittel des Puppenstadiums bestand ein statistisch erfassbarer Konzentrationsunterschied zu den ersten Tagen der Entwicklung (Tabelle 3.1). Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Puppen wurden nicht festgestellt. Die Konzentrationen der Kationen sind in Abb. 3.3 dargestellt. Die Daten, die der Abbildung zugrunde liegen, finden sich in Tabelle 6.4 auf Seite 113.

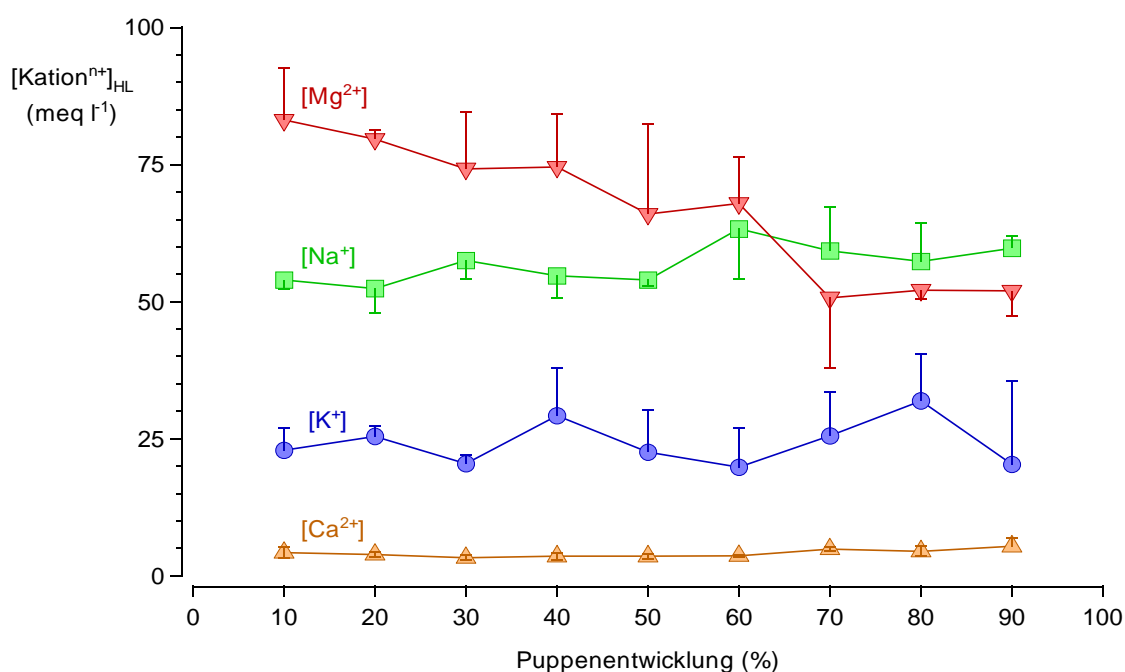


Abbildung 3.3 Konzentration von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium in der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n = 4 - 6, 100 % = 9 Tage). Für die Magnesiumkonzentration bestand ein signifikanter Unterschied zwischen 10 - 40 % und 70 - 90 % der Puppenentwicklung (siehe Tabelle 3.1).

Puppenentwicklung (%)	70	80	90
10	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,01$
20	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,01$
30	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$
40	$P \leq 0,05$	nicht signifikant	$P \leq 0,05$

Tabelle 3.1 Statistische Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Unterschiede der Magnesiumkonzentrationen in der Hämolymphe des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* während der Puppenentwicklung (TUKEY-KRAMER-t-Test).

3.5 Kationengehalt des Homogenats

Um eine Übersicht über den Ionenstatus des gesamten Tieres während der Puppenentwicklung zu erhalten, wurden die Konzentrationen der Kationen im Homogenat gemessen. Da der wässrige Auszug des Homogenats der Summe an extra- und intrazellulären Flüssigkeiten gleichzusetzen ist, wurde durch diesen Versuch die Gesamtkonzentration der Kationen im Tier bestimmt. Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Änderungen der Konzentrationen zwischen den einzelnen Altersstufen und zwischen den Geschlechtern (Abb. 3.4).

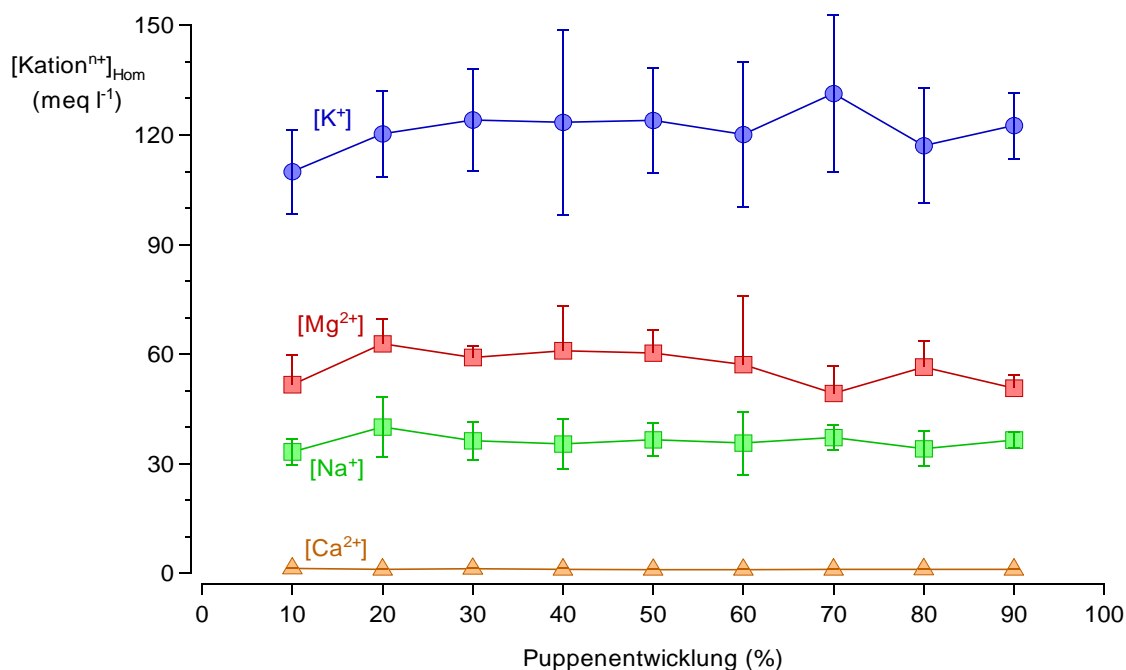


Abbildung 3.4 Konzentration von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium im Homogenat während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 4 - 6, 100 % = 9 Tage). Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die Konzentrationen der einzelnen Kationen aller Altersstufen wurden in einem Mittelwert zusammengefasst (Tabelle 3.2). Eine detaillierte Aufstellung der Resultate findet sich in Tabelle 6.5 auf Seite 114.

Kation	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
meq l ⁻¹	36,1 ± 1,9	121,4 ± 5,8	1,1 ± 0,1	56,4 ± 4,9

Tabelle 3.2 Konzentration von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium im Homogenat während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aller untersuchten Altersstufen (n = 41 - 42).

3.6 Chloridkonzentration der Hämolymphe

Zu Beginn der Entwicklung betrug die Chloridkonzentration der Hämolymphe etwas unter 80 meq l⁻¹. Sie nahm im Laufe der Entwicklung leicht ab, sank aber nie unter 60 meq l⁻¹ (siehe Abb. 3.5). Die Werte zu Beginn und zum Ende der Entwicklung unterschieden sich signifikant (Tabelle 3.3). Es bestanden keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Puppen. In Tabelle 6.6 auf Seite 114 findet sich die Ergebnisübersicht.

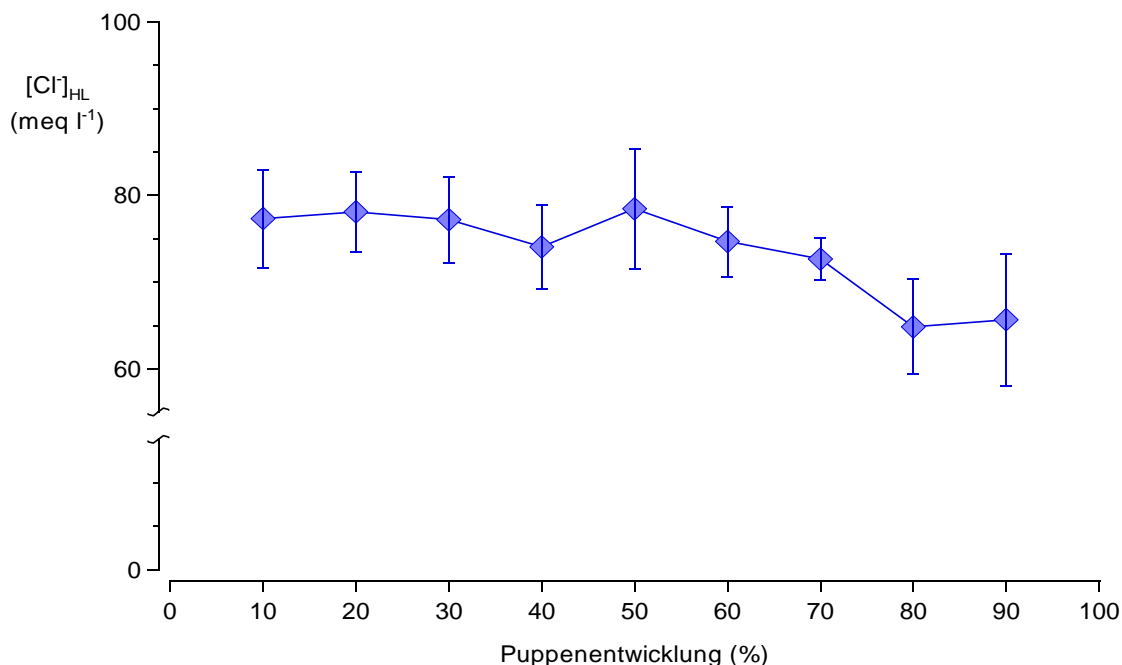


Abbildung 3.5 Chlorid-Konzentration in der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die Ordinate ist unterbrochen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4 - 10, 100% = 9 Tage). Am Ende der Entwicklung sind die Konzentrationen signifikant kleiner als zu Beginn (siehe Tabelle 3.3).

Puppenentwicklung (%)	10	20	30	50	60
80	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,05$
90	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,05$

Tabelle 3.3 Statistische Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Unterschiede der Chloridkonzentrationen in der Hämolymphe des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* während der Puppenentwicklung.

3.7 Chloridkonzentration des Homogenats

Der Chloridgehalt im Homogenat der Puppen wurde bereits in einer früheren Arbeit quantitativ bestimmt (GIERTH 1999 [L61]). Auf eine Wiederholung der Analyse wurde daher verzichtet. Während der Entwicklung der Puppen änderte sich die Chloridkonzentration des Homogenats nur geringfügig. Die Schwankungen zeigten keine Tendenz und waren statistisch nicht signifikant unterscheidbar. Die durchschnittliche Konzentration im Homogenat betrug $38,4 \pm 4,0$ mmol l⁻¹.

3.8 Proteinkonzentration der Hämolymphe

Die Proteinkonzentration schwankte um den mittleren Wert von $50,7 \pm 12,4 \text{ g l}^{-1}$ ($n = 107$) und schien zum Ende der Entwicklung hin geringer zu sein als zu Beginn. Aufgrund der hohen Standardabweichungen lassen sich allerdings keine statistisch relevanten Aussagen treffen. Die Proteinkonzentrationen in der Hämolymphe männlicher und weiblicher Puppen waren nicht unterschiedlich. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.6 dargestellt und in Tabelle 6.7 auf Seite 115 zusammengefasst.

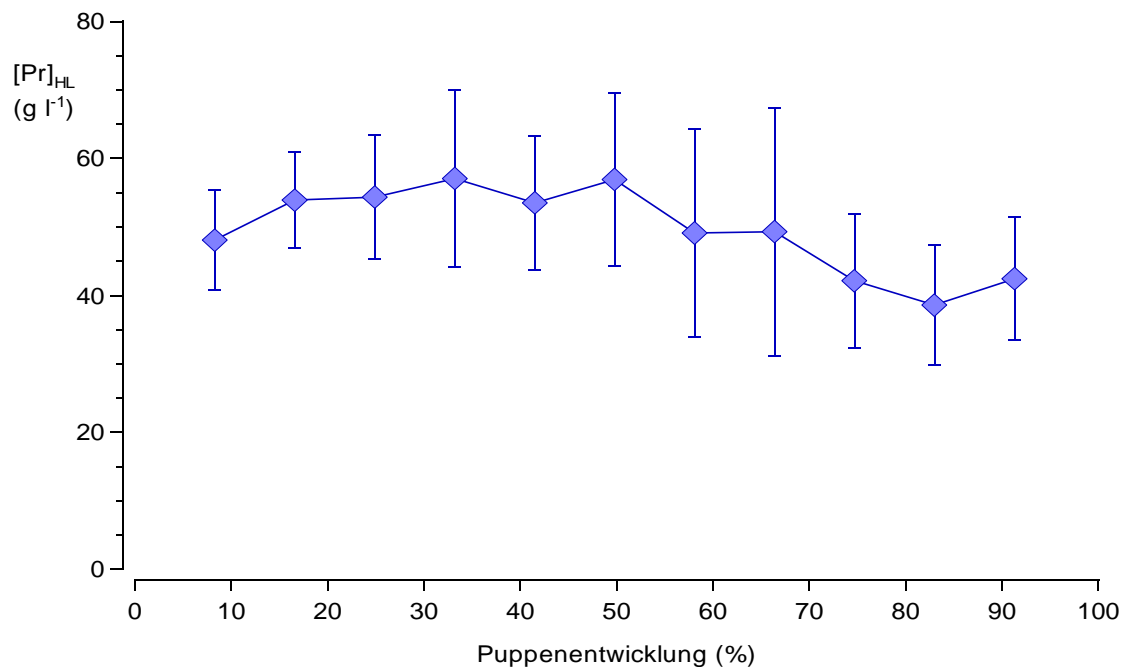


Abbildung 3.6 Proteinkonzentration in der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung ($n = 4 - 12$, 100% = 11 Tage). Die Proteinkonzentration änderte sich während der Entwicklung nur geringfügig.

3.9 Proteinkonzentration des Homogenats

Auch der Proteingehalt im Homogenat der Puppen wurde bereits in einer früheren Arbeit quantitativ bestimmt (GIERTH 1999 [L61]). Auf eine Wiederholung der Analyse wurde daher ebenfalls verzichtet. Während der Entwicklung der Puppen änderte sich die Proteinkonzentration nur geringfügig. Die Schwankungen zeigten keine Tendenz und waren statistisch nicht signifikant unterscheidbar. Die durchschnittliche Proteinkonzentration lag bei $51,2 \pm 5,2 \text{ g l}^{-1}$.

3.10 Freie Aminosäuren der Hämolymphe

Gesamtkonzentration und Nettoladung. Die Aminosäurekonzentration schwankte stark um den Mittelwert von ca. 40 mmol l^{-1} (Abb. 3.7 A). Dabei wurde nach 20 % der Entwicklungsphase mit $30,7 \text{ mmol l}^{-1}$ ein Minimum erreicht. Im Laufe der nächsten vier Tage stieg die Konzentration auf $54,7 \text{ mmol l}^{-1}$ an, um dann zum Ende auf $38,6 \text{ mmol l}^{-1}$ abzusinken. Nur zwischen minimaler und maximaler Konzentration bestand ein statistisch signifikanter Unterschied ($P \leq 0,05$). Die Nettoladung blieb während des gesamten Puppenstadiums positiv. Sie änderte sich nur wenig im Bereich physiologischer pH-Werte, erreichte aber zusammen mit dem Aminosäuregehalt in der Mitte der Entwicklung ein Maximum um $+15$ bis $+20 \text{ meq l}^{-1}$ (Abb. 3.7 B). Aminosäurekonzentration und Ladungsverteilung waren unabhängig vom Geschlecht der Versuchstiere.

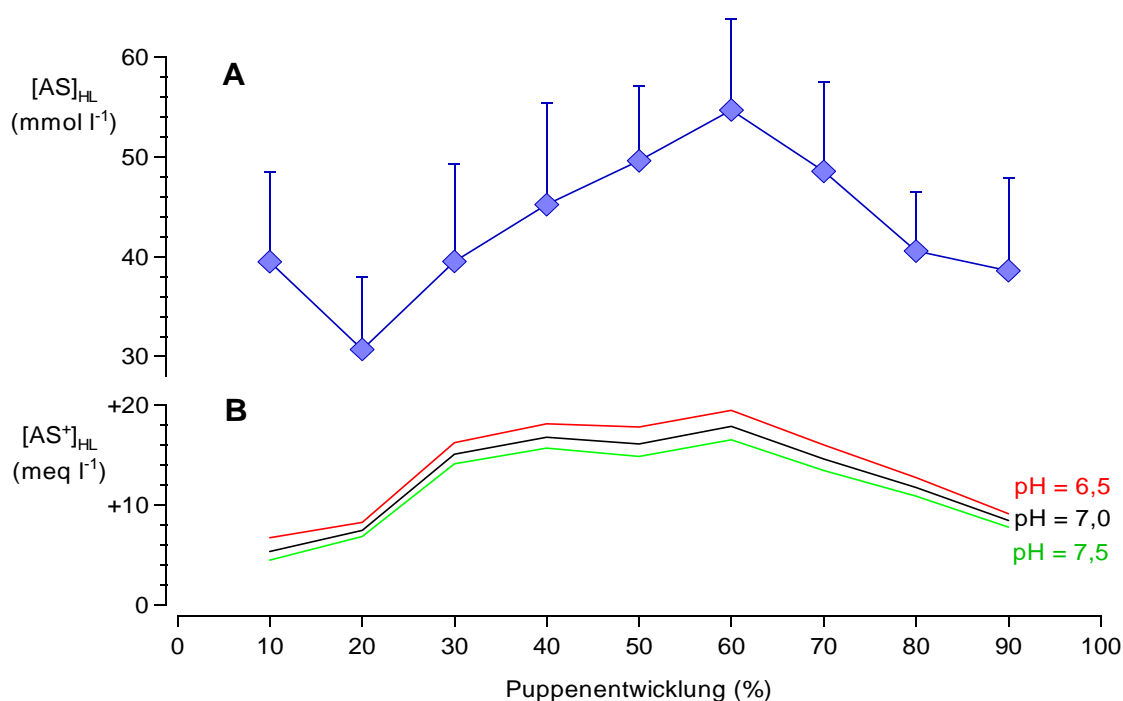


Abbildung 3.7 Konzentration von Aminosäuren in der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. (n = 4 - 5, 100 % = 9 Tage). **A:** Gesamtkonzentration an Aminosäuren ($[\text{AS}]_{\text{HL}}$) als Mittelwerte der einzelnen Altersstufen. **B:** Nettoladung ($[\text{AS}^+]_{\text{HL}}$) bei verschiedenen pH-Werten. Die Berechnung der Nettoladung erfolgte mithilfe der Gleichungen aus Kapitel 2.4 auf Seite 14.

Konzentration einzelner Aminosäuren. Aspartat und Methionin konnten in der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas* nicht nachgewiesen werden. Glutamat wurde nur zu Beginn der Entwicklung in Spuren gefunden. Auch Cystein wurde nur in einem Zeitraum von 20 bis 60 % der Entwicklungszeit in Spuren entdeckt.

Die Konzentrationen von Alanin, Arginin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin und Tryptophan lagen während der gesamten Entwicklung niedrig (unter $3,6 \text{ mmol l}^{-1}$). Die Konzentrationsänderungen waren statistisch nicht signifikant.

Andere Aminosäuren zeigten während der Entwicklung zum Teil erhebliche Konzentrationsunterschiede: Die Konzentration von Tyrosin stieg, nachdem sie kurz nach Beginn des Puppenstadiums annähernd auf 0 abgesunken war, wieder auf Werte über 6 mmol l^{-1} an (siehe

Abb. 3.8 oben links). Die Konzentrationen von Prolin und Histidin nahmen im Laufe der Entwicklung von Werten um 8 mmol l^{-1} auf etwa 3 mmol l^{-1} ab (Abb. 3.8 oben rechts). Zusammen mit Histidin zeigten die Aminosäuren Glycin und Serin Schwankungen in der Konzentration, die nach Durchlaufen eines Minimums bei 20 % einen Maximalwert bei 60 % der Puppenentwicklung erreichte. Die Konzentrationen sanken zum Ende des Puppenstadiums auf Werte, die niedriger lagen als zu Beginn (Abb. 3.8 unten links). Die Lysinkonzentration stieg auf ca. 15 mmol l^{-1} an, um nach einem Maximalwert bei 60 % der Entwicklungszeit wieder auf unter 10 mmol l^{-1} abzufallen (Abb. 3.8 unten rechts). Bei allen Aminosäuren wurden keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Puppen festgestellt. Die Tabellen mit der Signifikanzanalyse von Konzentrationsunterschieden der dargestellten einzelnen Aminosäuren finden sich im Anhang (siehe Tabelle 6.10 auf Seite 118).

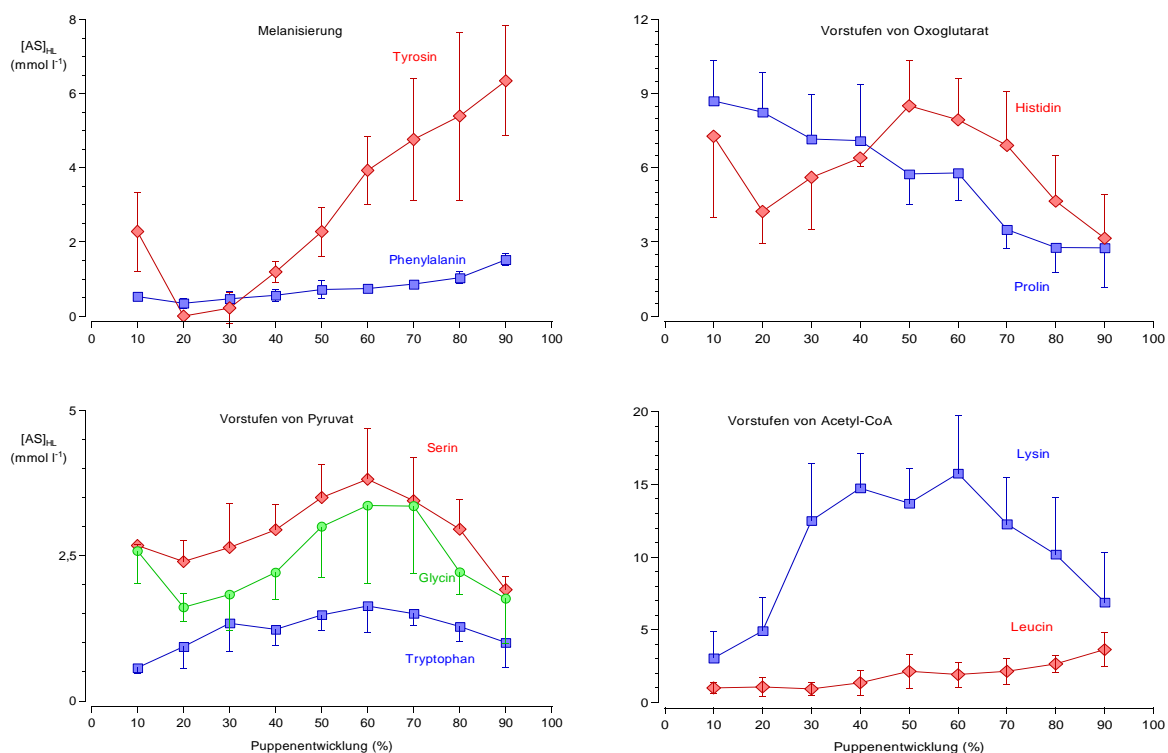


Abbildung 3.8 Konzentrationen von Aminosäuren in der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 4 - 5$, 100 % = 9 Tage). Die ausgewählten Aminosäuren sind Ladungsträger oder Substrate für anabolische und katabolische Stoffwechselwege. Alle anderen untersuchten Aminosäuren wurden nicht oder nur in Spuren nachgewiesen oder zeigten während der Puppenentwicklung keine signifikanten Konzentrationsänderungen. Die detaillierten Ergebnisse und die Signifikanzanalyse aller Aminosäuren sind im Anhang in Tabelle 6.9 auf Seite 116 und Tabelle 6.10 auf Seite 118 angegeben.

3.11 Freie Aminosäuren des Homogenats

Verglichen mit der Hämolymphe war die Konzentration der freien Aminosäuren im Homogenat etwa um den Faktor 3 erhöht. Während in der Hämolymphe keine signifikanten Konzentrationsänderungen während der Puppenentwicklung festzustellen waren, nahm die Gesamtkonzentration im Homogenat nach zwei Entwicklungstagen von etwa 130 mmol l⁻¹ auf Werte um 90 mmol l⁻¹ ab (Abb. 3.9). Die Abnahme wurde vor allem durch sinkende Konzentrationen von Prolin, Glycin und Arginin verursacht. Wie in der Hämolymphe war im Homogenat die Nettoladung der Aminosäuren positiv. Dies war vor allem auf die Aminosäuren Arginin und Lysin zurückzuführen, die in den Proben in hohen Konzentrationen vorlagen. Ein Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Puppen wurde nicht festgestellt. Die Werte für die einzelnen Aminosäuren sind in Tabelle 6.11 auf Seite 119 aufgeführt.

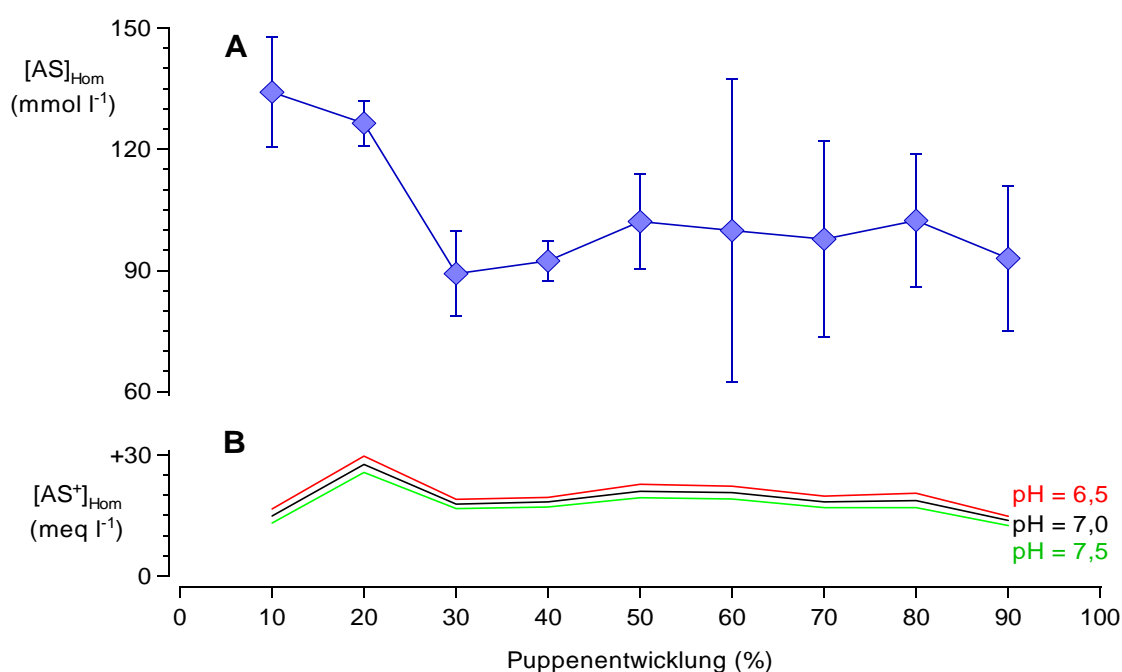


Abbildung 3.9 Aminosäuren im Homogenat während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* (n = 4 - 5, 100 % = 9 Tage). **A:** Gesamtkonzentration an Aminosäuren als Mittelwerte der einzelnen Altersstufen mit Standardabweichung. **B:** Ladungsverteilungen bei verschiedenen pH-Werten. Zur Berechnung der Ladungsverteilung siehe Material und Methoden, Seite 14.

3.12 Osmolarität der Hämolymphe

Die Osmolarität von Körperflüssigkeiten spiegelt deren Gehalt an gelösten Substanzen wider. In Abb. 3.10 ist die Osmolarität der Hämolymphe während der Puppenentwicklung aufgetragen. Sie schwankte um einen Betrag von $350 \text{ mosmol l}^{-1}$ und war zu Beginn des Puppenstadiums mit $372 \text{ mosmol l}^{-1}$ am höchsten. Im Laufe der Entwicklung sank sie signifikant ab (Tabelle 3.4). Die Werte waren bei männlichen und weiblichen Versuchstieren gleich. Die detaillierten Ergebnisse können aus Tabelle 6.8 auf Seite 115 ersehen werden.

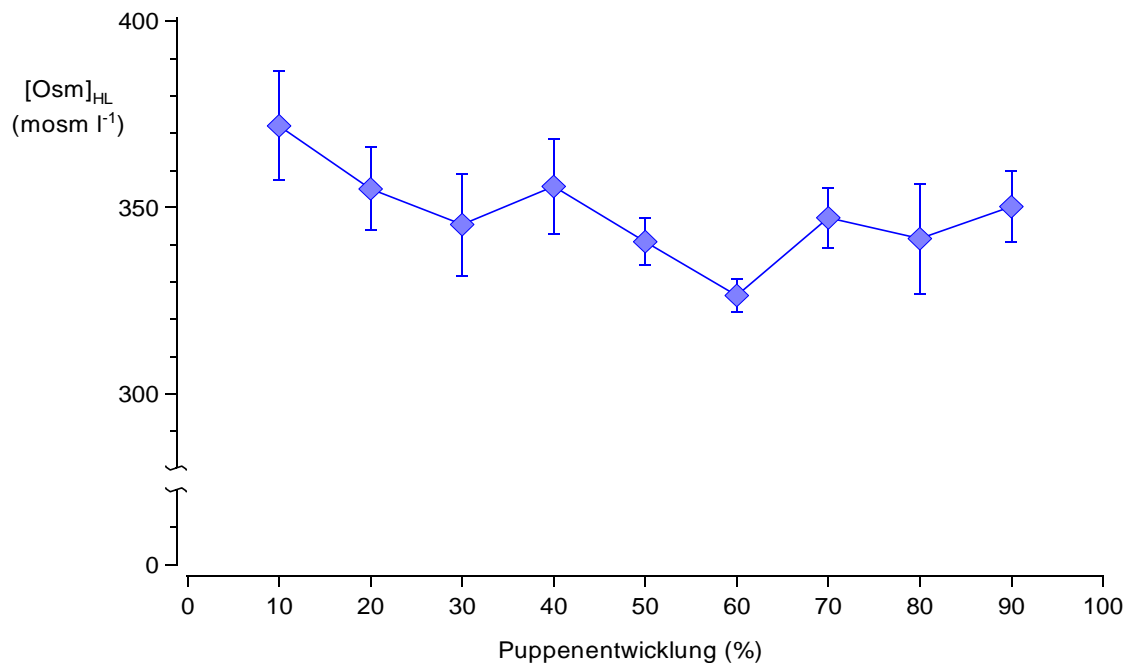


Abbildung 3.10 Osmolarität der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 5$, 100 % = 9 Tage). Die Ordinate ist unterbrochen dargestellt. Die Osmolaritäten im Zeitraum von 50 - 90 % unterscheiden sich signifikant vom Wert bei 10 % (siehe Tabelle 3.4).

Puppenentwicklung (%)	50	60	70	80	90
10	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,05$

Tabelle 3.4 Statistische Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Unterschiede der Osmolarität in der Hämolymphe des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* während der Puppenentwicklung.

Die Summe der bisher in ihrer molaren Konzentration untersuchten Bestandteile der Hämolymphe deckt nur einen Teil der gesamten gemessenen Osmolarität (Abb. 3.11). Der Anteil beträgt maximal 73,5 % nach 60 % der Puppenentwicklung und minimal 56,8 % am Ende des Puppenstadiums.

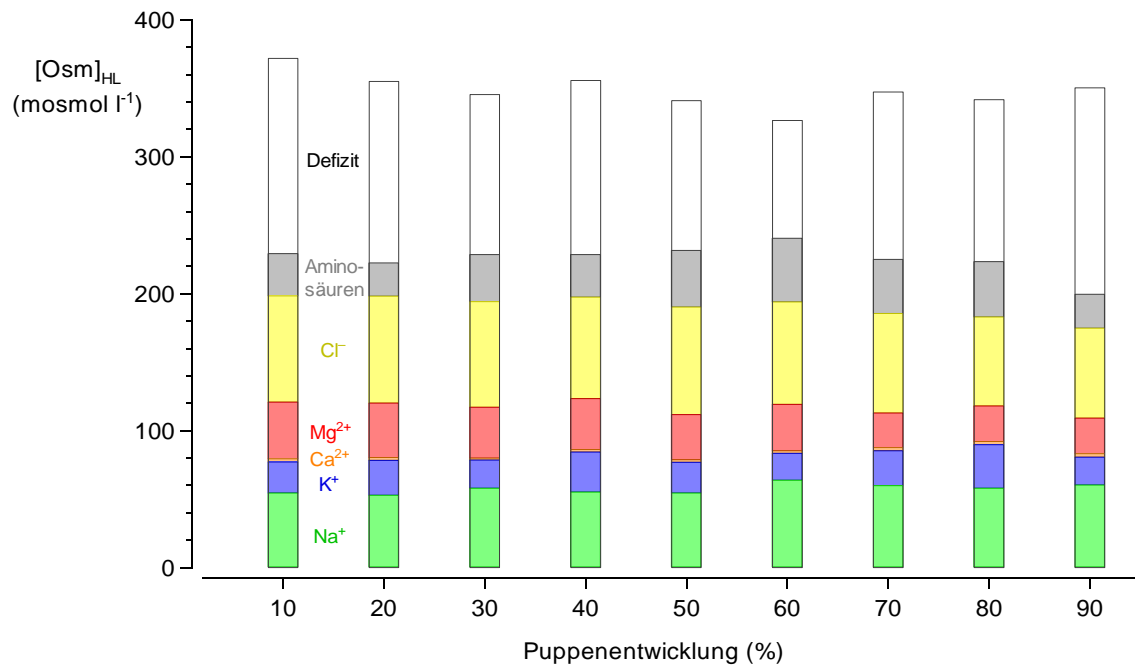


Abbildung 3.11 Osmolaritätsbilanz der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Dargestellt sind die summierten Osmolaritäten der bisher untersuchten Substanzen außer Proteinen und die gemessene Osmolarität. Zwischen gemessener und aufsummierter Osmolarität besteht während des gesamten Puppenstadiums ein Defizit.

3.13 Ionenbilanz der Hämolymphe

Die Bilanz der bisher untersuchten Ionen in der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas* ist in Abb. 3.12 dargestellt.

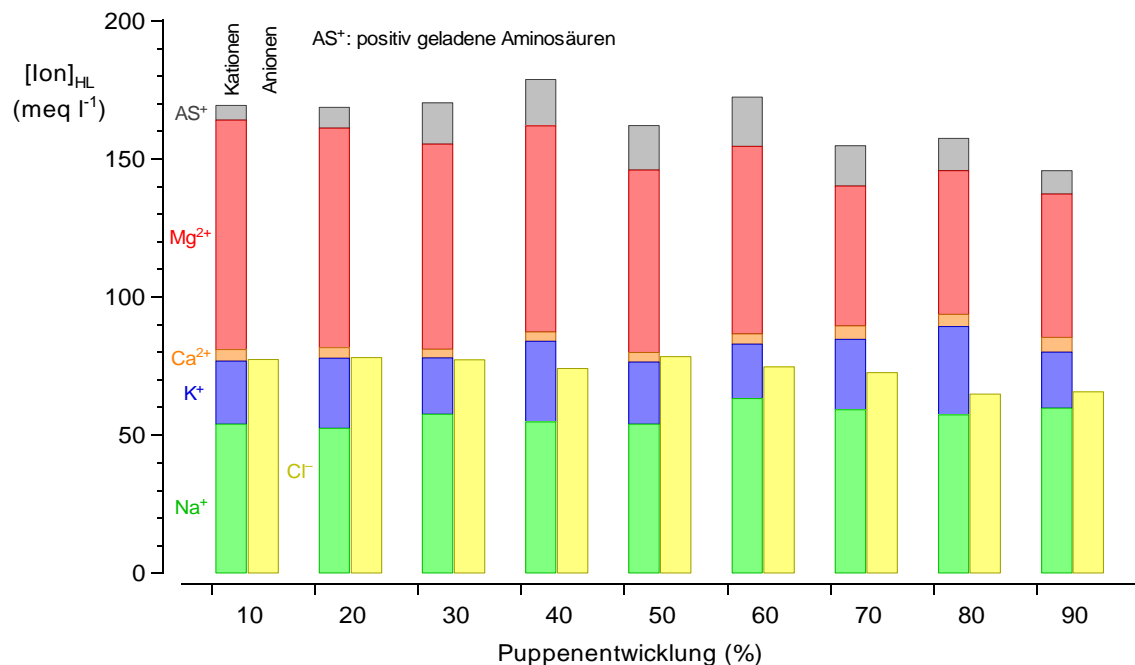


Abbildung 3.12 Ionenbilanz der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Dargestellt sind Kationen und Aminosäuren (linke Säulen) und Anionen (rechte Säulen). Die Bilanz weist während der gesamten Entwicklung ein deutliches Anionendefizit auf. Die Bilanz der einwertigen anorganischen Ionen ist während der gesamten Entwicklung annähernd ausgeglichen.

Die Bilanz zwischen Kationen und Anionen in der Hämolymphe muss wegen der Elektroneutralität immer ausgeglichen sein. Ein Vergleich der gemessenen Konzentrationen von Kationen und Anionen ermöglicht, einen scheinbaren Kationen- oder Anionenüberschuss zu erfassen. Die Bilanz der bisher untersuchten Ionen zeigt während der gesamten Entwicklung ein deutliches Anionendefizit. In der Hämolymphe müssen also noch andere negativ geladene Bestandteile vorhanden sein.

3.14 Konzentration von untersuchten Substanzen im Gewebe

Die Wasserfraktionen der einzelnen Kompartimente wurden in Kapitel 3.3 auf Seite 24 bestimmt und auf ihren Anteil am Gesamtwassergehalt umgerechnet. Somit war die Berechnung der Stoffkonzentrationen im Gewebewasser möglich. Die mit Gleichung 7 auf Seite 16 berechneten Werte der untersuchten Inhaltsstoffe sind in Tabelle 3.5 angegeben. Für Calcium wurden aufgrund der implizierten Messungenauigkeiten negative Werte errechnet. Dieses Ion wurde aus diesem Grund als „im Gewebe nicht vorhanden“ definiert. Die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren und die für alle untersuchten Bestandteile durch Fehlerfortpflanzung berechneten Minimal- und Maximalwerte (siehe Kapitel 2.5 auf Seite 16) sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 6.12 auf Seite 121).

Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
[Na ⁺] (meq l ⁻¹)	21,5	33,5	20,4	21,0	24,5	17,7	25,8	24,1	24,0
[K ⁺] (meq l ⁻¹)	159,0	170,1	201,7	193,4	194,5	185,5	185,8	153,6	177,1
[Mg ²⁺] (meq l ⁻¹)	33,9	53,9	47,7	50,7	56,2	50,0	48,4	58,3	50,0
[Cl ⁻] (meq l ⁻¹)	12,1	13,3	4,5	8,9	13,0	11,5	21,3	30,5	24,4
Proteine (g l ⁻¹)	52,1	50,0	47,2	46,8	48,6	51,9	55,0	57,1	60,5
Aminosäuren (mmol l ⁻¹)	193,0	179,3	129,3	129,9	142,0	132,2	126,0	131,7	124,8

Tabelle 3.5 Konzentrationen der untersuchten Substanzen im Gewebewasser während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*, berechnet aus den Konzentrationen und den Wasserfraktionen von Homogenat und Hämolymphe (Gleichung 7 auf Seite 15). Calcium wurde als im Gewebe nicht vorhanden definiert. Die Werte der einzelnen Aminosäuren sind im Anhang in Tabelle 6.12 auf Seite 121 angegeben.

3.15 Physikalischer Löslichkeitskoeffizient und pK-Wert

In den vorangegangenen Messungen wurden die Einflussgrößen Molarität, Ionenstärke, Natrium- und Proteinkonzentration bestimmt. Die Messtemperatur betrug 15 °C. Der pH-Wert wurde auf 7,0 festgelegt, da dieser Wert im Verlauf der nachfolgenden Experimente gemessen wurde. Somit war nach der Gleichung von HEISLER die Berechnung von α und pK-Wert für das Homogenat und die Kompartimente Hämolymphe und Gewebe möglich [L76].

Die Werte für α sind in Tabelle 3.6 aufgeführt. Im Anhang finden sich zusätzlich Minimal- und Maximalwerte für α und pK-Werte, die sich durch Einsetzen der Grenzwerte aus der Fehlerfortpflanzung ergaben (Tabelle 6.13 auf Seite 122 und Tabelle 6.14 auf Seite 123).

	Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
α_{HL}	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,057
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,422	0,423	0,422	0,421	0,422	0,421	0,422	0,424	0,425
α_{Hom}	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,055	0,054	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,409	0,408	0,412	0,412	0,410	0,412	0,411	0,411	0,412
α_{Gew}	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,054	0,053	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,402	0,400	0,405	0,405	0,402	0,406	0,405	0,406	0,406

Tabelle 3.6 Physikalischer Löslichkeitskoeffizient α für Kohlendioxid in Hämolymphe (α_{HL}), Homogenat (α_{Hom}), und Gewebe (α_{Gew}) während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* berechnet nach der Formel von HEISLER [L76].

	Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
pK	Hämolymphe	6,178	6,178	6,179	6,177	6,182	6,181	6,191	6,193	6,196
	Homogenat	6,186	6,174	6,178	6,177	6,176	6,179	6,180	6,180	6,182
	Gewebe	6,190	6,172	6,177	6,177	6,171	6,178	6,174	6,174	6,175

Tabelle 3.7 pK-Werte für die Reaktion von Kohlendioxid mit Wasser in Hämolymphe, Homogenat und Gewebe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* berechnet nach der Formel von HEISLER [L76].

3.16 Kohlendioxidgehalt *in vitro*

Um Aussagen über die Speicherkapazität für Kohlendioxid in den einzelnen Kompartimenten der Puppen treffen zu können, wurde der Kohlendioxidgehalt von Homogenat und Hämolymphe bei verschiedenen CO₂-Partialdrücken untersucht (Kapitel 2.6 auf Seite 17).

Hämolymphe. In Abb. 3.13 ist der CO₂-Gehalt der Hämolymphe in Abhängigkeit vom eingestellten CO₂-Partialdruck dargestellt. Die Ergebnisse für einzelne Altersstufen und für männliche und weibliche Puppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Aus diesem Grund wurden die Werte aller untersuchten Altersstufen zusammengefasst (Tabelle 6.15 auf Seite 123). Der Kohlendioxidgehalt stieg von $11,4 \pm 1,1$ mmol l⁻¹ bei 2 kPa auf

$20,2 \pm 1,1 \text{ mmol l}^{-1}$ bei 8 kPa. Die Regressionsfunktion zeigt einen hyperbolischen Verlauf (Abb. 3.13). Der Kapazitätskoeffizient β , der durch Differenzierung der CO_2 -Konzentrationsfunktion berechnet wurde, nahm mit steigendem CO_2 -Partialdruck exponentiell ab. Im Bereich von 2 bis 8 kPa sank der Kapazitätskoeffizient von 2,36 auf $1,05 \text{ mmol l}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$.

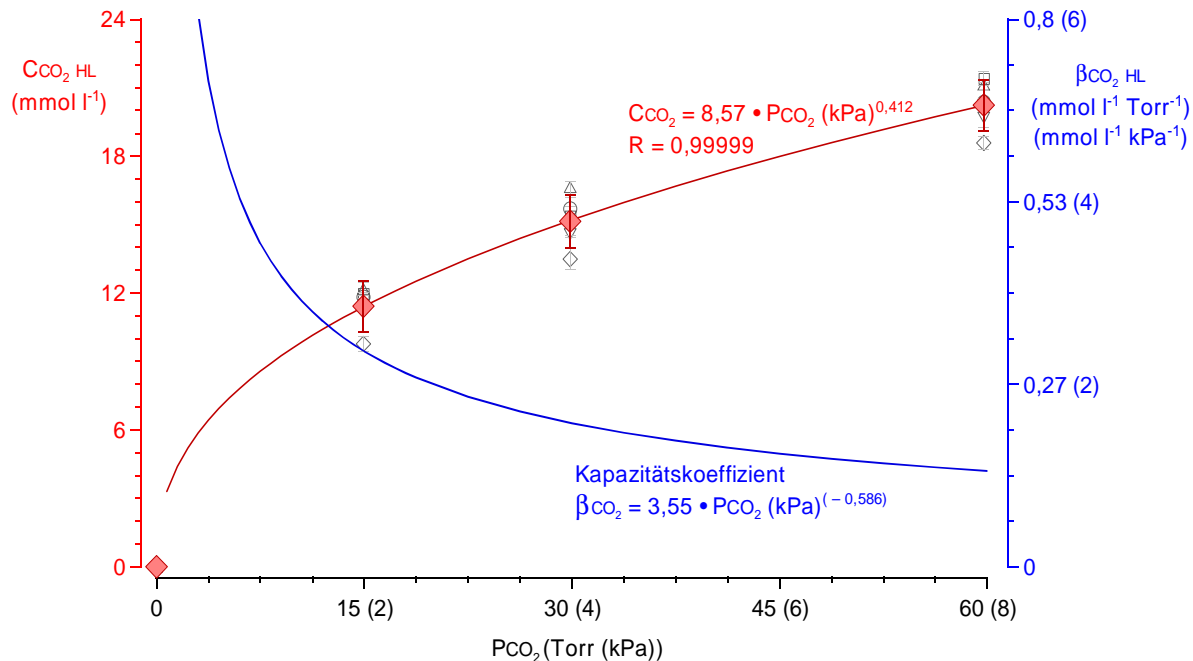


Abbildung 3.13 CO_2 -Sättigungsfunktion und Kapazitätskoeffizient β der Hämolymphe von Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die Ergebnisse einzelner Altersstufen (Symbole ohne Kurven) unterscheiden sich nicht. Die steigende Funktion stellt die gemeinsame CO_2 -Bindungskurve aller Altersstufen dar. Die exponentiell abnehmende Funktion ist der aus der Regressionsfunktion abgeleitete Kapazitätskoeffizient β für Kohlendioxid in der Hämolymphe.

Homogenat. Auch der Kohlendioxidgehalt des Homogenats war nicht altersabhängig (Abb. 3.14). Die Ergebnisse aller Altersstufen wurden unabhängig vom Geschlecht zu einem Wert pro Partialdruck zusammengefasst. Die Kohlendioxidkonzentration im Homogenat stieg von $6,2 \pm 0,8 \text{ mmol l}^{-1}$ bei 2,0 kPa auf $14,1 \pm 1,1 \text{ mmol l}^{-1}$ bei 7,4 kPa. Die Regressionsanalyse ergab eine hyperbolische Funktion (Abb. 3.14 auf Seite 37). Der Kapazitätskoeffizient β nahm mit steigendem CO_2 -Partialdruck exponentiell ab. Von 2 bis 7,4 kPa sank der Kapazitätskoeffizient von 1,94 auf $1,16 \text{ mmol l}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$.

Gewebe. Mit Hilfe der Gleichung 7 auf Seite 16 konnte aus den gemessenen CO_2 -Konzentrationen für die Hämolymphe und das Homogenat die CO_2 -Konzentration im Gewebe der Puppen berechnet werden. In Abb. 3.15 auf Seite 37 sind die Ergebnisse für das Gewebe den Werten für die Hämolymphe und für das Homogenat gegenübergestellt.

Die Abbildung verdeutlicht, dass die CO_2 -Konzentrationen im Gewebe bei gleichem P_{CO_2} stets geringer sind als in der Hämolymphe. Mit $3,5 \text{ mmol l}^{-1}$ bei 2,0 kPa und $11,7 \text{ mmol l}^{-1}$ bei 8 kPa ergaben sich erhebliche Unterschiede zu den Konzentrationen, die in der Hämolymphe gefunden wurden. In diesem Partialdruckbereich sank der Kapazitätskoeffizient von 1,53 auf $1,27 \text{ mmol l}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$.

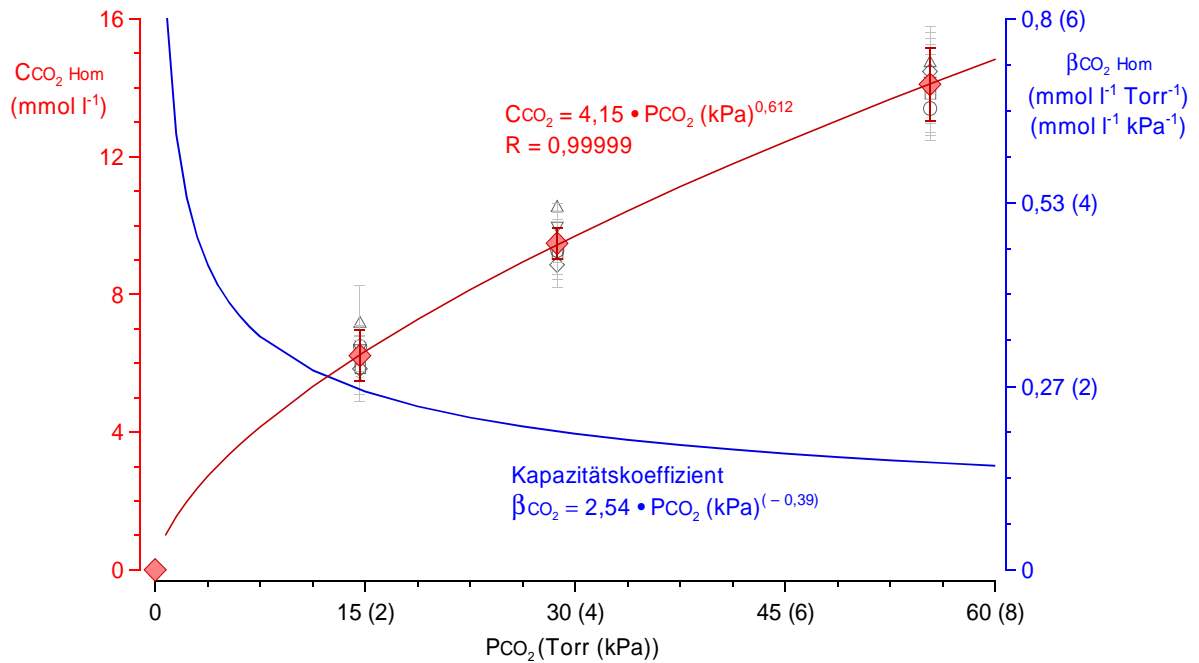


Abbildung 3.14 CO₂-Sättigungsfunktion und Kapazitätskoeffizient β des Homogenats von Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die Ergebnisse einzelner Altersstufen (Symbole ohne Kurven) unterscheiden sich nicht. Die steigende Funktion stellt die gemeinsame CO₂-Bindungskurve aller Altersstufen dar. Die exponentiell abnehmende Funktion ist der aus der Regressionsfunktion abgeleitete Kapazitätskoeffizient β für Kohlendioxid im Homogenat.

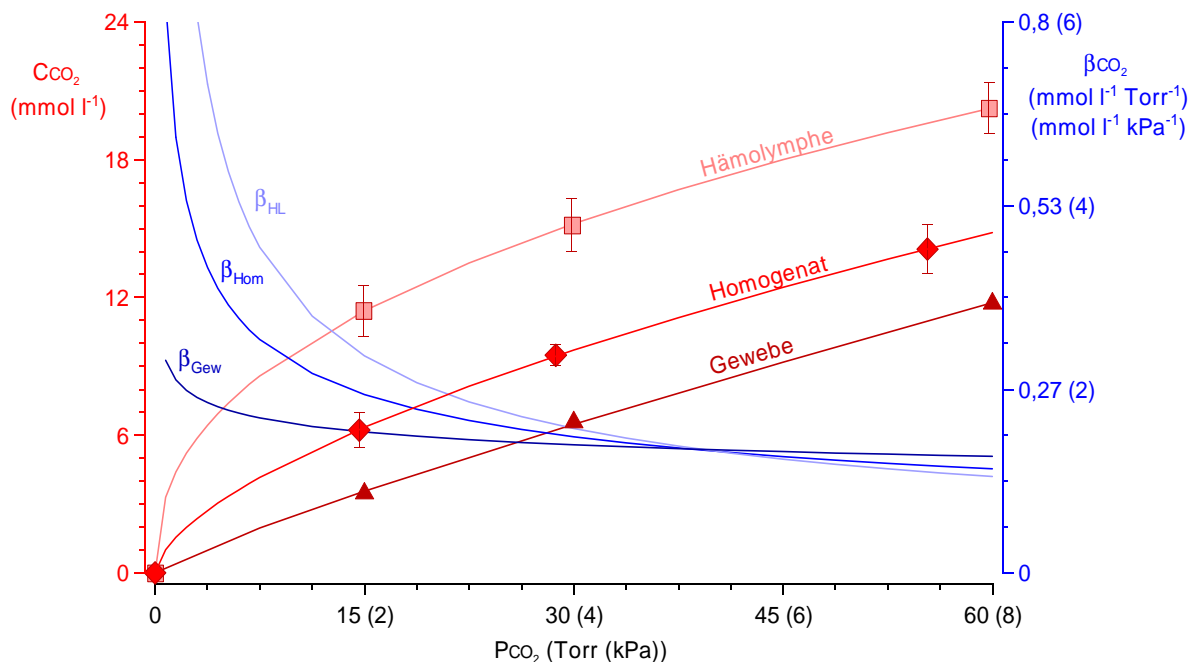


Abbildung 3.15 CO₂-Sättigungsfunktionen und Kapazitätskoeffizienten β der Kompartimente bei Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die steigenden Funktionen stellen die CO₂-Bindungskurven für das jeweilige Kompartiment dar. Die exponentiell abnehmenden Funktionen sind aus der Regressionsfunktion abgeleitete Kapazitätskoeffizienten β für Kohlendioxid im jeweiligen Kompartiment (HL: Hämolymphe, Hom: Homogenat, Gew: Gewebe).

3.17 pH-Bikarbonat-Diagramm und Pufferwert *in vitro*

Um Aussagen darüber zu treffen, wie Hämolymphe und Gewebe der Puppen durch die stoffwechselbedingte Kohlendioxidproduktion angesäuert werden und zu welchem Anteil die entstehenden Protonen gepuffert werden können, wurde ein pH-Bikarbonat-Diagramm erstellt. In den vorangegangenen Experimenten wurden alle Parameter ermittelt, die als Variablen für eine Berechnung von pH-Wert und Bikarbonatkonzentration in die umgeformte HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung einzusetzen sind (Gleichung 10 auf Seite 19 und Gleichung 11 auf Seite 19).

In Abb. 3.16 sind die berechneten Ergebnisse für Hämolymphe und Gewebe dargestellt. Die Pufferwerte betrugen $17,0 \text{ meq l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$ für die Hämolymphe und $59,3 \text{ meq l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$ für das Gewebe.

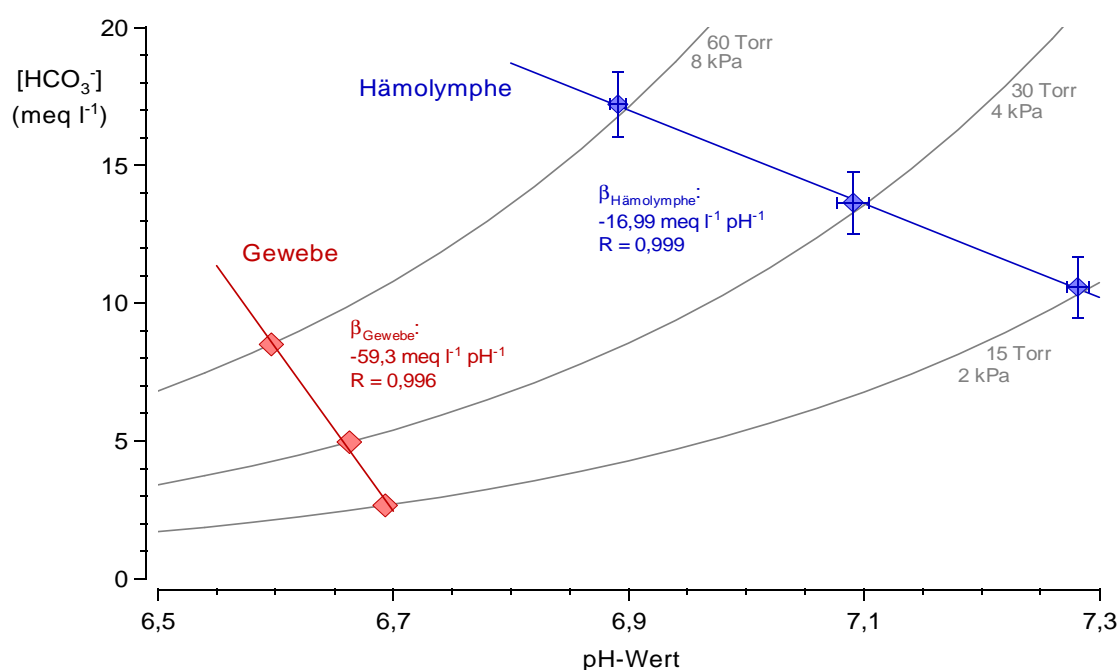


Abbildung 3.16 pH-Bikarbonat-Diagramm für Hämolymphe und Gewebe von Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die Steigungen der Geraden entsprechen dem Pufferwert β_{NB} aller Nichtbikarbonatpuffer der Kompartimente. Bikarbonatkonzentration, pH-Wert und Pufferwert sind unabhängig vom Alter und vom Geschlecht der Puppen.

3.18 Zusammenfassung der *in vitro* Ergebnisse

Einige der untersuchten Parameter ändern sich während der gesamten Puppenentwicklung nicht oder nur geringfügig: die Konzentrationen aller analysierten anorganischen Ionen im Homogenat und, mit Ausnahme von Magnesium, auch in der Hämolymphe, bleiben nahezu konstant. Einige der untersuchten Parameter, wie die Magnesiumkonzentration und die Aminosäurekonzentration in der Hämolymphe, zeigen während der Puppenentwicklung auffällige Veränderungen. Die Konzentrationsänderungen haben jedoch keine Auswirkungen auf die Speicherfähigkeit für Kohlendioxid oder auf den Säure-Basen-Status in den einzelnen Kompartimenten. CO_2 -Kapazität, Bikarbonatkonzentration und Pufferwert von Hämolymphe, Homogenat und Gewebe verändern sich während des gesamten Puppenstadiums nicht.

3.19 *in vivo* Untersuchungen

Da der Säure-Basen-Status unabhängig vom Alter der Puppen war, wurden die Messungen *in vivo* stellvertretend für das gesamte Puppenstadium auf Versuchstiere im Alter von 3 - 5 Tagen beschränkt. In dieser Zeit erreichte der Stoffwechsel ein Minimum und die Stoffwechselrate der Puppen zeigte die geringsten Schwankungen (siehe Abb. 1.2 auf Seite 3). Die zeitgleiche Messung der Kohlendioxidabgaberate und des pH-Werts in der Hämolymphe erfolgte an 26 Puppen.

CO₂-Abgabe. Alle Versuchstiere gaben vor der Implantation der Elektroden Kohlendioxid diskontinuierlich ab (siehe Abb. 1.1 auf Seite 2). Die mittlere Kohlendioxidabgaberate aller Puppen betrug vor der Implantation $26,6 \pm 7,6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ($N = 26$). Ein Zyklus dauerte im Mittel $8,8 \pm 2,6 \text{ min}$. Der Burst der Öffnungsperiode konnte deutlich von der Interburstperiode unterschieden werden. Eine Unterteilung in Konstriktions- und Flatterperiode konnte aufgrund der zu geringen zeitlichen Auflösung des Mess-Systems nicht getroffen werden.

Die Implantation der Elektroden verursachte stets eine Erhöhung der Stoffwechselrate und eine Verkürzung der Zyklusdauer (Abb. 3.17).

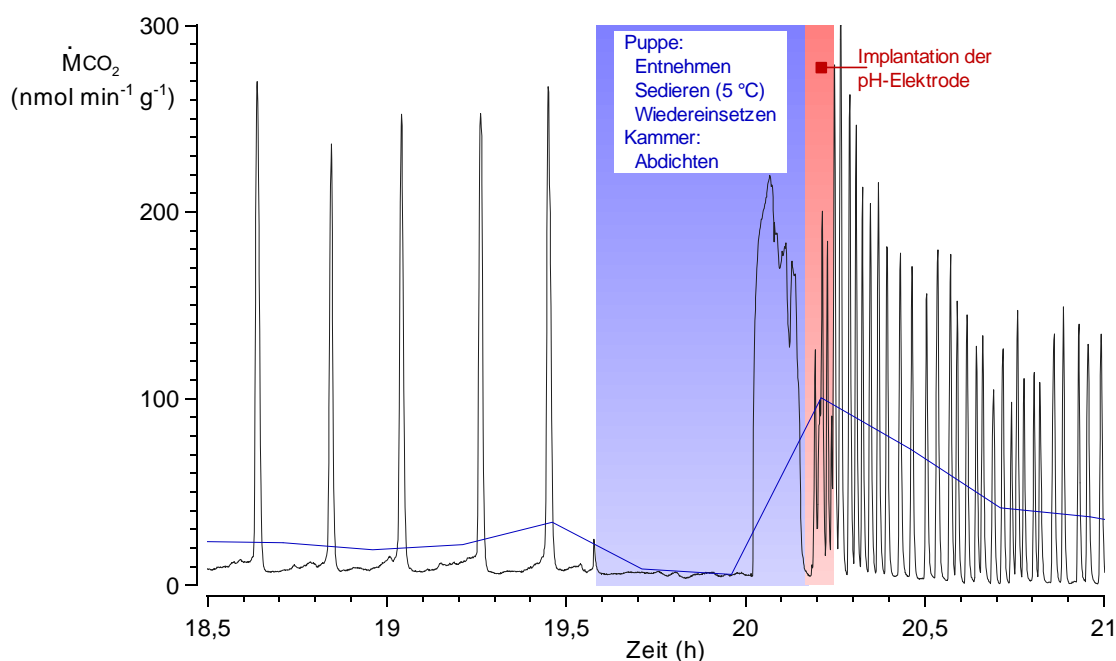


Abbildung 3.17 Änderung der CO₂-Abgaberate bei *Zophobas rugipes* im Puppenstadium verursacht durch Implantation von Elektroden. Dargestellt sind die gemessene CO₂-Abgaberate und Mittelwerte über 15 Minuten. Vor der Implantation wurden die Puppen für 30 Minuten bei 5 °C gekühlt. Die Implantation dauerte etwa fünf Minuten (Originaldaten von Versuchstier 3652, männlich, 3 Tage alt, 0,713 g).

Bei zehn Puppen erfolgte nach Implantation der Elektroden weiterhin eine diskontinuierliche CO₂-Abgabe. In den anderen Versuchen wurde eine kontinuierliche Kohlendioxidabgabe festgestellt. Die mittlere Abgaberate stieg nach der Implantation auf $37,0 \pm 10,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ($N = 26$). Die mittlere Zyklusdauer der Puppen mit diskontinuierlicher CO₂-Abgabe sank nach der Implantation auf $4,3 \pm 1,3 \text{ min}$ ($N = 10$).

Die Zyklusdauer während der diskontinuierlichen Kohlendioxidabgabe unbeeinflusster Puppen hing von der CO_2 -Abgaberate ab (Abb. 3.18). War die Abgaberate hoch, war die Zyklusdauer kurz. Eine niedrige Kohlendioxidabgaberate hatte langandauernde Zyklen zur Folge. Bei der niedrigsten gemessenen CO_2 -Abgaberate von ca. $10,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ betrug die Zyklusdauer etwa 13 min. Der durch die Implantation der Elektroden verursachte Anstieg der CO_2 -Abgaberate auf über $40,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ verkürzte die Zyklusdauer auf 2 - 3 min. Die Beziehung zwischen CO_2 -Abgaberate und Zyklusdauer veränderte sich durch die Implantation der Elektroden nicht.

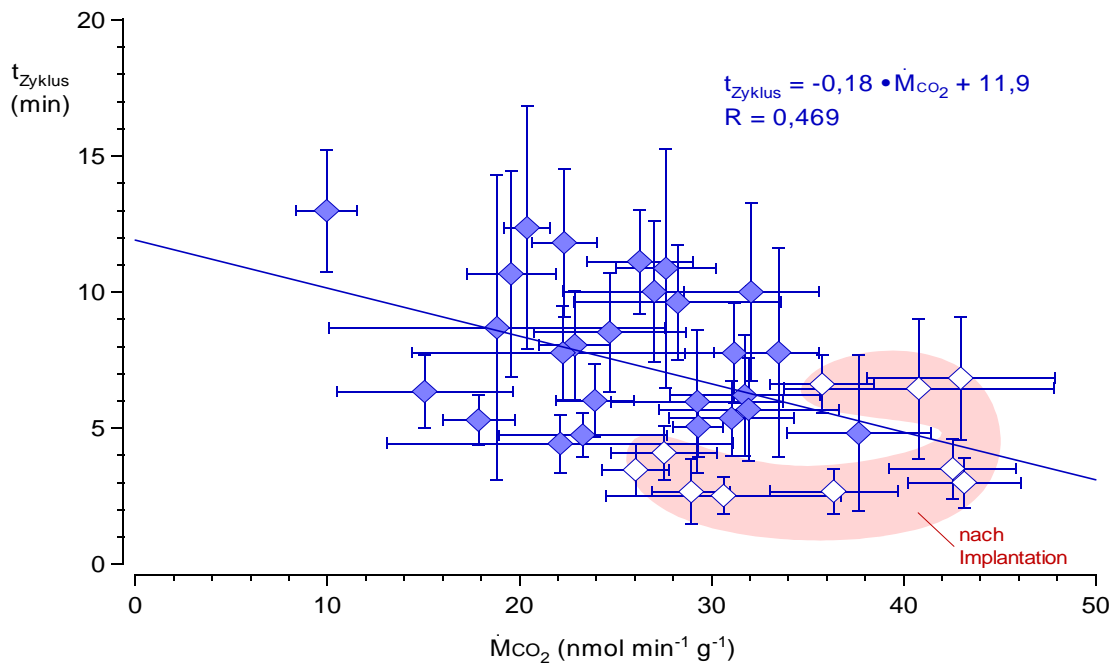


Abbildung 3.18 Zyklusdauer in Abhängigkeit von der Kohlendioxidabgaberate bei *Zophobas rugipes* im Puppenstadium. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von 26 Puppen vor (Anzahl der Versuchstiere: $N = 26$, gefüllte Rauten) und nach ($N = 10$, offene Rauten) der Elektrodenimplantation (Anzahl der Zyklen pro Versuchstier: $n = 21 - 235$). Puppen mit diskontinuierlicher CO_2 -Abgabe nach der Implantation zeigten hohe Stoffwechselraten und kurze Zyklen.

Je länger ein Zyklus andauerte, desto mehr Kohlendioxid wurde während des Zyklus abgegeben. Puppen mit diskontinuierlicher Kohlendioxidabgabe nach der Implantation verloren demnach aufgrund der kurzer Zyklen nur geringe Mengen an CO_2 (Abb. 3.19). Die Implantation der Elektroden hatte keinen Einfluss auf die Abhängigkeit zwischen Zyklusdauer und abgegebener CO_2 -Stoffmenge im Zyklus.

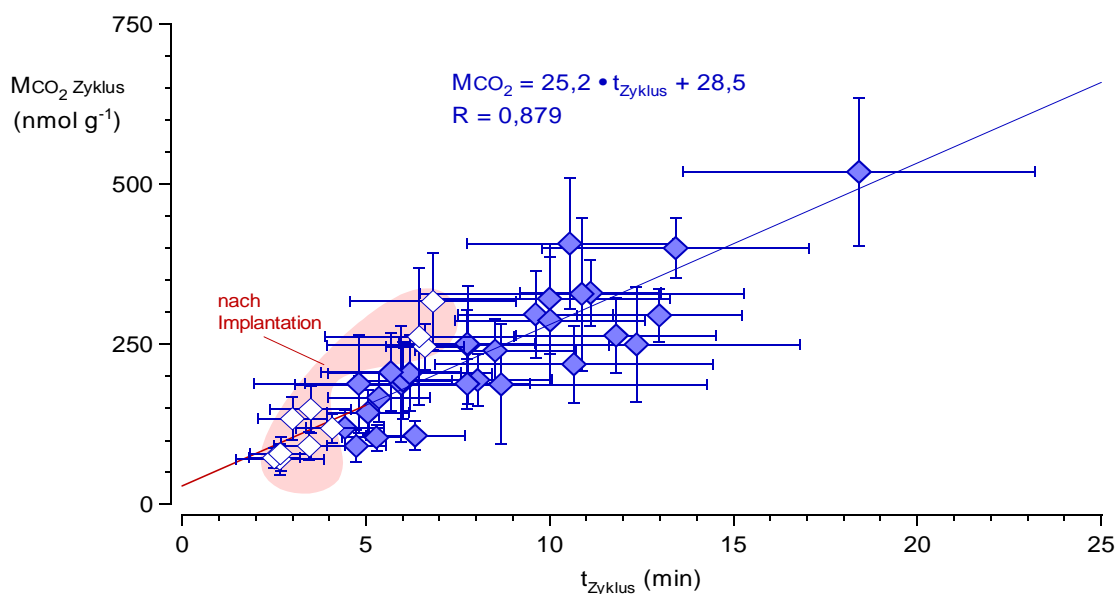


Abbildung 3.19 Abgegebene Kohlendioxidmenge im Zyklus in Abhängigkeit von der Zyklusdauer bei *Zophobas rugipes* im Puppenstadium. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von 26 Puppen vor ($N = 26$, gefüllte Rauten) und nach ($N = 10$, offene Rauten) der Elektrodenimplantation ($n = 21 - 235$). Puppen mit diskontinuierlicher CO_2 -Abgabe nach der Implantation gaben während kurzer Zyklen geringe Kohlendioxidstoffmengen ab.

Die Burstdauer nahm bei steigenden Zykluslängen kaum zu. Die Interburstperiode dauerte immer länger als die Öffnungsperiode (Abb. 3.20). Unbehandelte und behandelte Puppen zeigten die selbe Abhängigkeit.

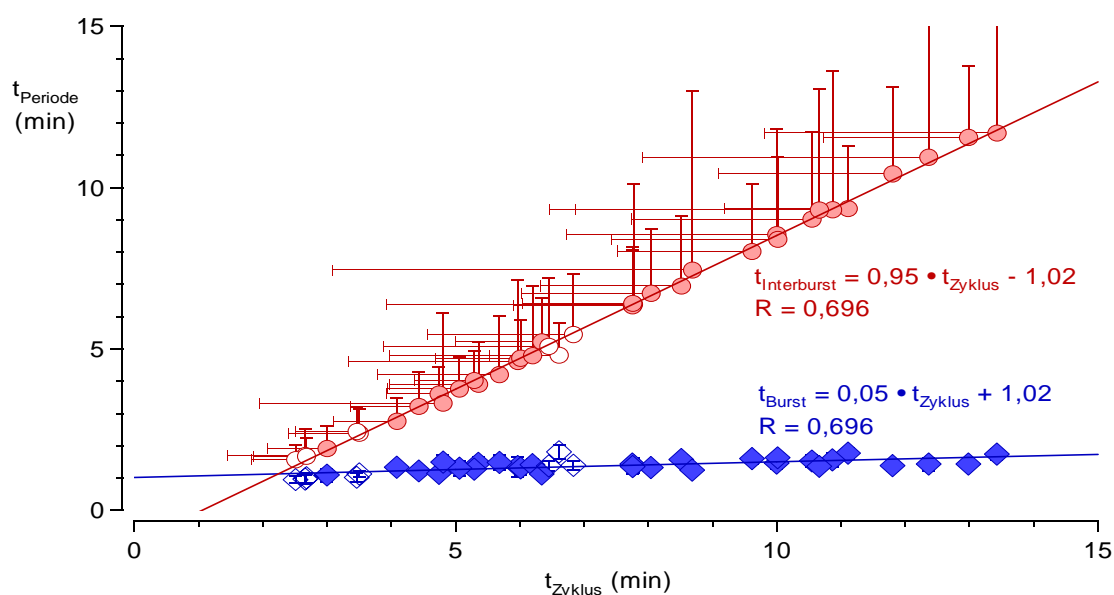


Abbildung 3.20 Dauer der zur Interburstperiode zusammengefassten Konstriktions- und Flutterperiode (Kreise) und der Öffnungsperiode (Rauten) in Abhängigkeit von der Zyklusdauer bei *Zophobas rugipes* im Puppenstadium. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von 26 Puppen vor ($N = 26$, gefüllte Symbole) und nach ($N = 10$, offene Symbole) der Elektrodenimplantation ($n = 21 - 235$). Die Dauer der Öffnungsperiode (Burst) änderte sich kaum (1,2 - 1,6 Minuten).

Die Kohlendioxidmenge, die während einer Öffnungsperiode abgegeben wurde, korrelierte mit der Stoffmenge, die im gesamten Zyklus in die Atmosphäre gelangte (Abb. 3.21). Dieser Zusammenhang konnte bei Zyklen vor und nach der Implantation beobachtet werden. Der Anteil von Kohlendioxid, der im Burst abgegeben wurde, sank auf unter 70 %, in manchen Fällen auf 40 %, wenn die im gesamten Zyklus abgegebene CO₂-Menge zunahm.

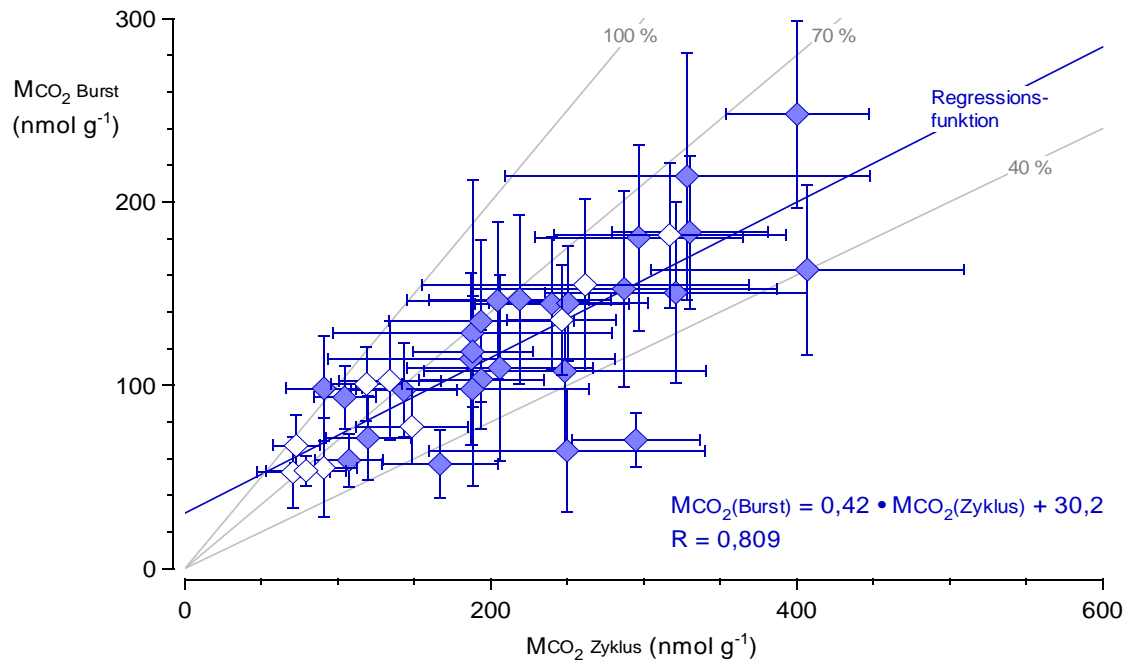


Abbildung 3.21 Abgegebene Kohlendioxidmenge in der Öffnungsperiode in Abhängigkeit von der abgegebenen Kohlendioxidmenge im gesamten Zyklus bei *Zophobas rugipes* im Puppenstadium. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von 26 Puppen vor (N = 26, gefüllte Rauten) und nach (N = 10, offene Rauten) der Elektrodenimplantation (n = 21 - 235). Die CO₂-Stoffmenge in der Öffnungsperiode war proportional zur CO₂-Stoffmenge im Zyklus. Der Anteil der Öffnungsperiode wurde mit zunehmender im Zyklus abgegebener CO₂-Stoffmenge.

Der Anteil des in der Interburstperiode abgegebenen Kohlendioxids war gering während kurzer Zyklen, also bei geringen CO₂-Mengen im Zyklus. Wurden die Zyklen länger und die pro Zyklus abgegebenen Kohlendioxidmengen größer, wurde Kohlendioxid allmählich zu gleichen Teilen während Öffnungs- und Interburstperiode abgegeben (Abb. 3.22).

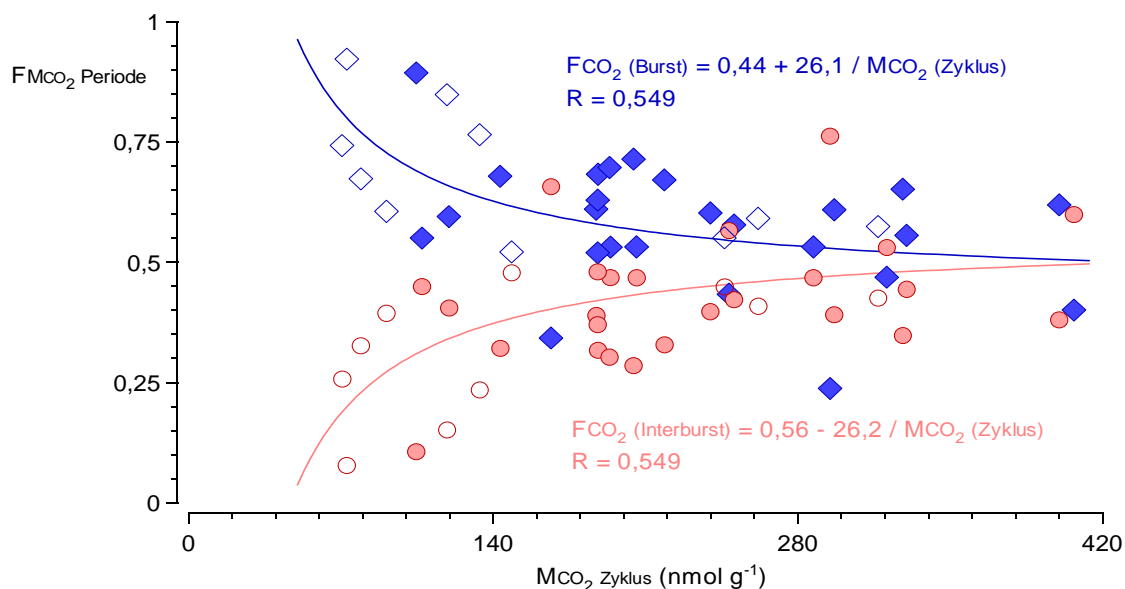


Abbildung 3.22 Anteil der Kohlendioxidmenge, die in Interburstperiode (Kreise) und Öffnungsperiode (Rauten) abgegeben wurde, in Abhängigkeit von der CO_2 -Menge des gesamten Zyklus. Angegeben sind Mittelwerte von 26 Puppen vor ($N = 26$, gefüllte Rauten) und nach ($N = 10$, offene Rauten) der Elektrodenimplantation ($n = 21 - 235$).

pH-Wert. Der in der Hämolymphe gemessene pH-Wert hing von der Art der Kohlendioxidabgabe ab. In der Hämolymphe von Puppen mit diskontinuierlicher CO_2 -Abgabe folgte der pH-Wert den zyklischen Schwankungen des Kohlendioxidgehalts. Während der Öffnungsperiode stieg der pH-Wert durch den Verlust von $11 - 287 \text{ nmol g}^{-1} CO_2$ um etwa $0,006 - 0,017$ Einheiten. Nach Ende der Öffnungsperiode sank der pH-Wert durch die CO_2 -Speicherung in der Interburstperiode (Abb. 3.23, links). Bei kontinuierlicher CO_2 -Abgabe konnte keine Abhängigkeit zwischen pH-Wert der Hämolymphe und Kohlendioxidabgabe gemessen werden (Abb. 3.23, rechts).

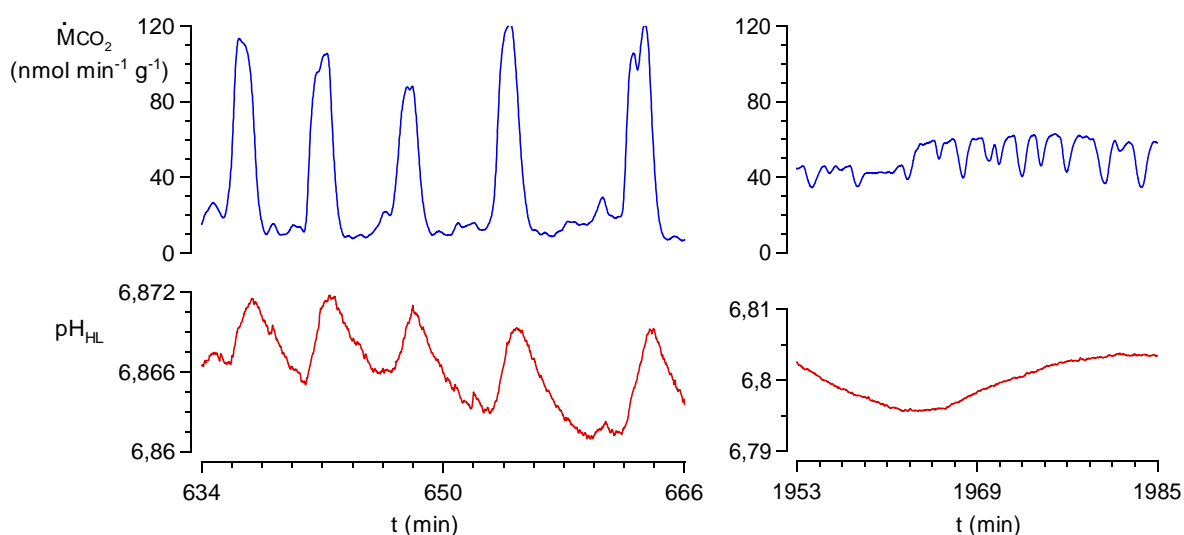


Abbildung 3.23 Zeitgleiche Messung von Kohlendioxidabgabe und Hämolymphe-pH-Wert bei *Zophobas rugipes* im Puppenstadium. Links: diskontinuierliche CO_2 -Abgabe. (Originaldaten von Versuchstier 1976, weiblich, 4 Tage alt, $0,636 \text{ g}$). Rechts: kontinuierliche CO_2 -Abgabe. (Originaldaten von Versuchstier 1906, männlich, 4 Tage alt, $0,675 \text{ g}$).

Der mittlere pH-Wert in der Hämolymphe aller untersuchten Puppen betrug $6,897 \pm 0,091$ ($N = 26$). Bei Puppen, die Kohlendioxid diskontinuierlich abgaben, wurden niedrigere Abgaberraten und höhere pH-Werte gemessen, als bei Puppen mit kontinuierlichem CO_2 -Ausstoß (Abb. 3.24). Diese Unterschiede waren aber statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

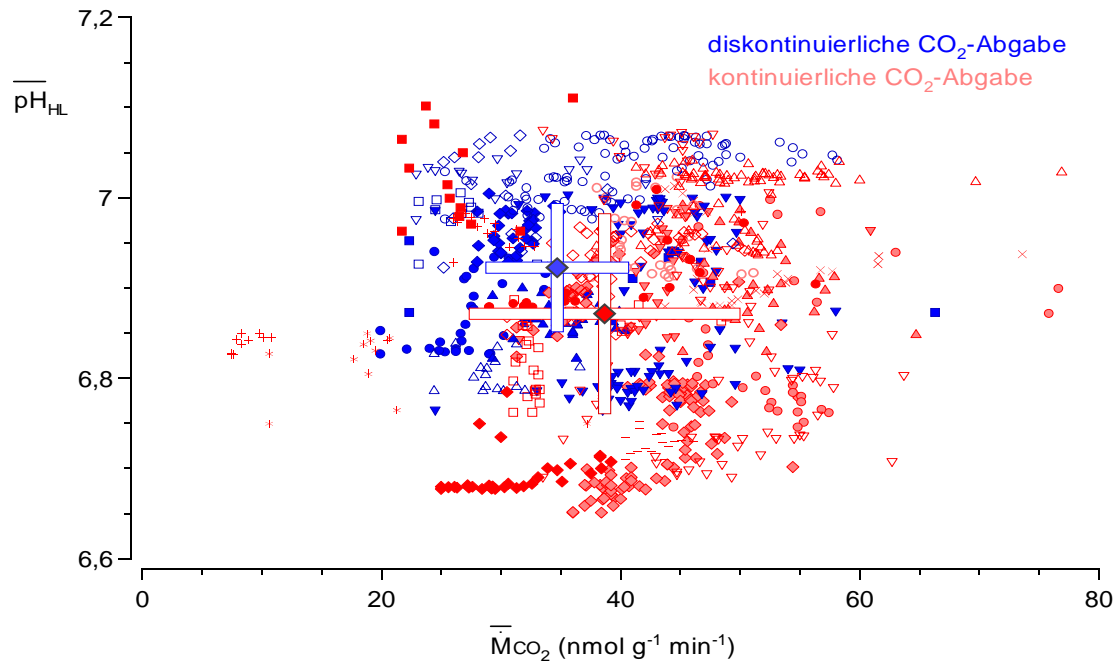


Abbildung 3.24 pH-Wert der Hämolymphe und mittlere Stoffwechselrate von *Zophobas rugipes* im Puppenstadium. Jedes Symbol stellt einen Mittelwert über 30 min dar. Gleiches Symbol bedeutet gleiches Tier. Die Symbole mit Standardabweichungsbalken sind die Mittelwerte aller Puppen mit diskontinuierlicher CO_2 -Abgabe (blau, $N = 10$, $n = 338$) und aller Puppen mit kontinuierlicher CO_2 -Abgabe (rot, $N = 16$, $n = 625$, N : Anzahl der Puppen, n : Anzahl der Mittelwerte über 30 Minuten).

	N	n	\dot{M}_{CO_2}	S.A.	max	min	pH	S.A.	max	min
gesamt	26	963	37,00	9,97	76,9	7,5	6,897	0,091	7,111	6,651
diskontinuierlich	10	338	34,70	5,98	58	19,9	6,922	0,071	7,069	6,765
kontinuierlich	16	625	38,67	11,32	76,9	7,5	6,876	0,093	7,111	6,651

Tabelle 3.8 Mittlere CO_2 -Abgaberrate und mittlerer pH-Wert von *Zophobas rugipes* im Puppenstadium. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie Minimal- und Maximalwerte für alle Puppen, getrennt nach diskontinuierlicher und kontinuierlicher CO_2 -Abgaberrate. (N : Anzahl der Puppen, n : Anzahl der 30-Minuten-Werte).

Durch die Kohlendioxidabgabe während der Öffnungsperiode stieg der pH-Wert in der Hämolymphe (siehe Abb. 3.23 auf Seite 43). Die abgegebene CO_2 -Menge korrelierte dabei mit der Änderung des pH-Werts. Um die Werte der einzelnen Puppen vergleichen zu können, wurde die gewichtsspezifische Stoffmengenabgabe von Kohlendioxid im Burst und die Konzentrationsänderung der Protonen in der Hämolymphe miteinander verglichen. Für die Ergebnisse jeder

einzelnen Puppe wurde eine Regressionsfunktion berechnet. Die Regressionen waren für jede Puppe verschieden, aber statistisch nicht unterscheidbar. Aus diesem Grund wurde eine Regressionsfunktion für alle Werte aufgestellt (Abb. 3.25).

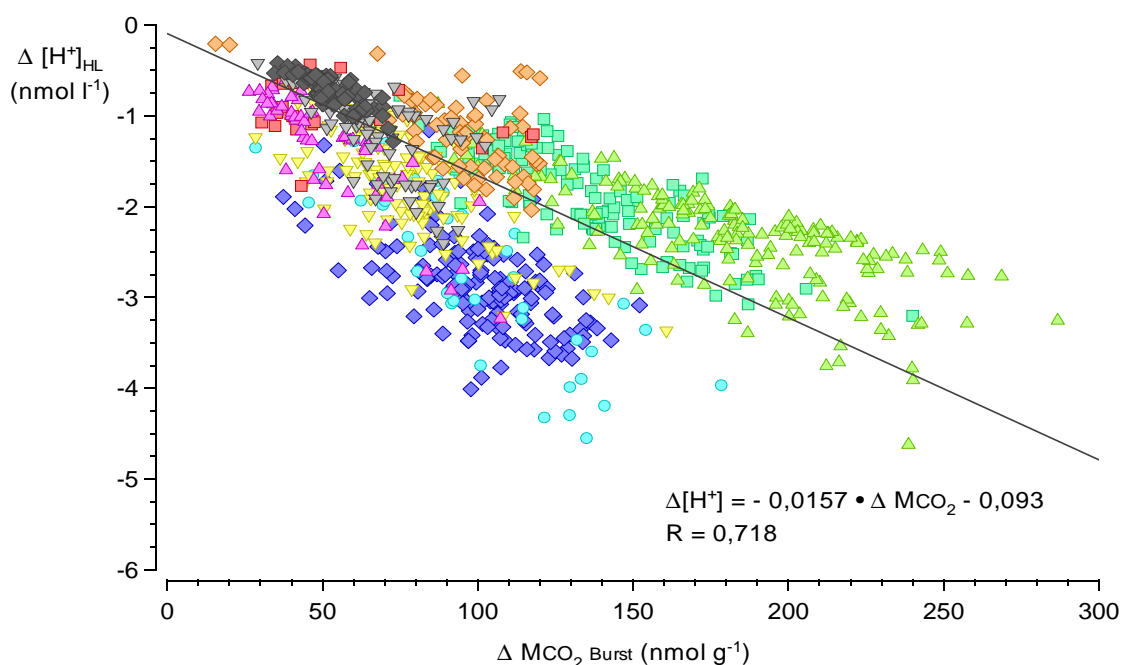


Abbildung 3.25 Änderung der Protonenkonzentration in Abhängigkeit von der Menge abgegebenen Kohlendioxids pro Burst bei *Zophobas rugipes* im Puppenstadium. Gleiche Symbole bedeuten gleiche Puppe (N = 10). Ein Symbol entspricht einem Burst (n = 43 - 180 pro Puppe). Die Steigungen der Regressionsfunktionen der einzelnen Puppen sind statistisch nicht unterscheidbar (Student-t-Test, $P \leq 0,01$ [L153]).

pH-Wert bei Hyperkapnie. Um den Einfluss des Kohlendioxidpartialdrucks auf die CO_2 -Abgabe und den pH-Wert der Hämolymphe zu untersuchen, wurden Puppen mit hyperkapnischer Umgebungsluft äquilibriert. Die Erhöhung des P_{CO_2} führte zu einer Anreicherung von Kohlendioxid in den Puppen. Daraus resultierte eine Erhöhung des CO_2 -Gehalts, des P_{CO_2} und des pH-Werts in der Hämolymphe. Nach jedem der drei hyperkapnischen Zeitabschnitte eines Versuches folgte eine Erholungs- und Kontrollphase in Kohlendioxid freier Umgebungsluft. Ein Beispiel eines Hyperkapnieversuchs ist in Abb. 3.26 dargestellt. Eine detaillierte Übersicht über verwendete Versuchstiere, Reihenfolge und Beträge der eingestellten CO_2 -Partialdrucke, sowie Dauer der Versuche findet sich in Tabelle 6.17 auf Seite 124.

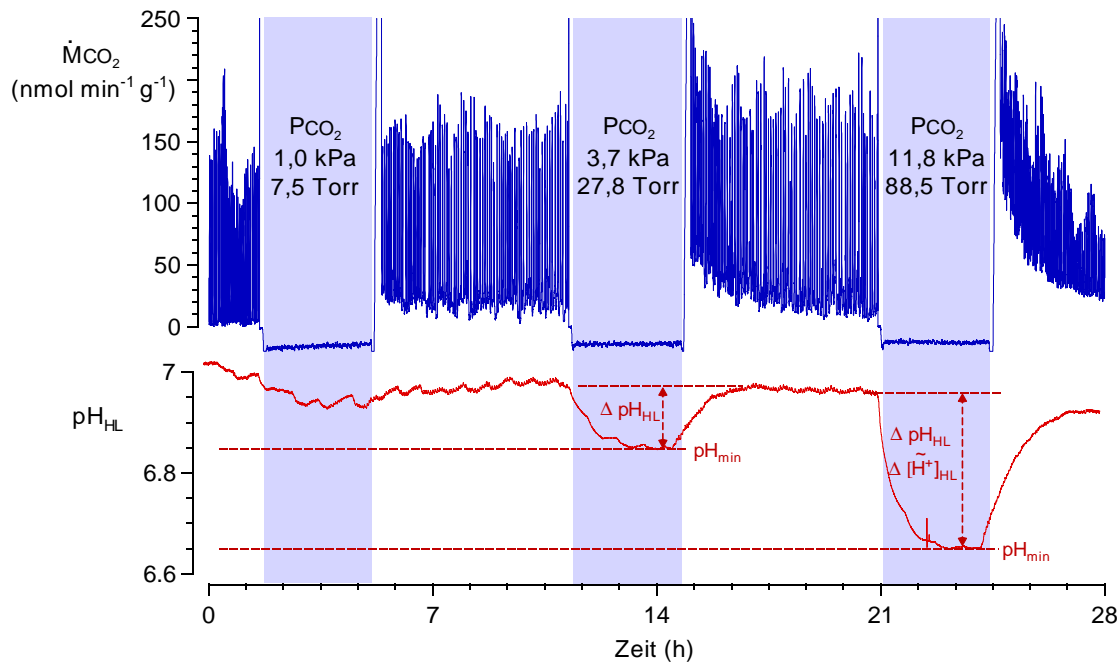


Abbildung 3.26 Hyperkapnie-Experiment bei *Zophobas rugipes* im Puppenstadium. Dargestellt sind CO_2 -Abgaberate (oben) und pH-Wert der Hämolymphe (unten). Die Phasen der Hyperkapnie (je 3 Stunden bei 1,0, 3,7 und 11,8 kPa) sind hinterlegt. Die pH-Wert-Differenz wurde aus pH-Wert zu Beginn und Minimalwert während der Hyperkapnie berechnet. Während Hyperkapnie war keine Messung der CO_2 -Abgaberate möglich. Das exponentiell abnehmende Basissignal der CO_2 -Messung entstand durch Kohlendioxid, das sich nach der Hyperkapnie aus der Versuchskammer und den Schläuchen löste (Originaldaten von Versuchstier 3652, männlich, 3 Tage alt, 0,713 g).

Da sich der Luftdruck zwischen den Messungen veränderte, schwankten die eingestellten CO_2 -Partialdrucke um 0,3 - 1,6 %. Die vom Partialdruck abhängige, exponentiell abnehmende Basislinie im CO_2 -Signal zu Beginn der Erholungsphase entstand durch Kohlendioxid, das sich während der Hyperkapnie im Material der Versuchskammer und der Zuleitungen anreicherte und mit der CO_2 -freien Luft ausgewaschen wurde.

Um den Einfluss des externen Partialdrucks auf den internen pH-Wert der Hämolymphe zu quantifizieren, wurde der minimale pH-Wert bestimmt, der während der hyperkapnischen Phase erreicht wurde, und gegen den eingestellten P_{CO_2} aufgetragen (Abb. 3.27). Zwischen beiden Parametern besteht ein direkter Zusammenhang. Je höher der Kohlendioxidpartialdruck, desto niedriger der minimale pH-Wert. Der pH-Wert fiel bei höheren Partialdrucken stärker als bei niedrigen. Bei einem externen Partialdruck von 1 kPa waren in drei der vier Versuche keine Änderungen des pH-Werts feststellbar.

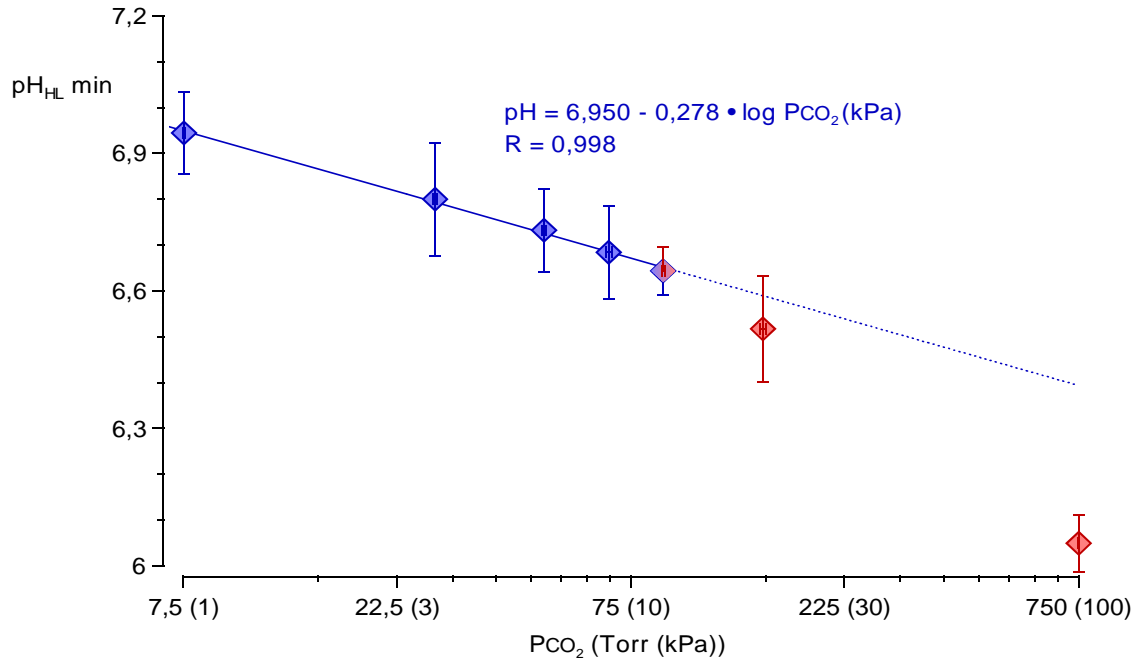


Abbildung 3.27 Minimaler pH-Wert der Hämolymphe von *Zophobas rugipes* im Puppenstadium während hyperkapnischer Bedingungen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 4 -6 Einzelmessungen (Ausnahme bei 20 kPa: n = 2). Der minimale pH-Wert hing in logarithmischer Weise vom externen Partialdruck ab. Die bei niedrigen CO₂-Partialdrücken geringen Änderungen wurden unverhältnismäßig größer, wenn der CO₂-Partialdruck über 11,6 kPa stieg.

Obwohl die pH-Werte der Hämolymphe vor den hyperkapnischen Phasen in einem weiten Bereich zwischen 6,7 und 7,1 streuten, unterschieden sich die gemessenen minimalen pH-Werte wenig. Nach der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung ändert sich der pH-Wert bei Änderungen des CO₂-Partialdrucks nach folgender Gesetzmäßigkeit [L76]:

$$\Delta pH = \log \left(\frac{P_{CO_2}(1)}{P_{CO_2}(2)} \right) \quad (\text{Gleichung 12})$$

Dieser Zusammenhang gilt nur, wenn die Bikarbonatkonzentration vor und nach der pH-Wert-Änderung gleich bleibt. Nach Delogarithmieren von Gleichung 12 ergibt sich:

$$\Delta[H^+] = \frac{P_{CO_2}(2)}{P_{CO_2}(1)} \quad (\text{Gleichung 13})$$

$P_{CO_2}(1)$ stellt den CO₂-Partialdruck in der Puppe vor dem Hyperkapnieversuch dar.

Sind die CO₂-Partialdrucke (1) und (2) gleich, so ändert sich die Protonenkonzentration nicht. Um den Einfluss der Hyperkapnie zu quantifizieren, wurde aus den gemessenen Hämolymphe-pH-Werten die Änderung der Protonenkonzentration berechnet und gegen den eingestellten CO₂-Partialdruck aufgetragen. Es ergab sich ein linearer Zusammenhang über den gesamten Bereich der eingestellten Kohlendioxidpartialdrucke (Abb. 3.28).

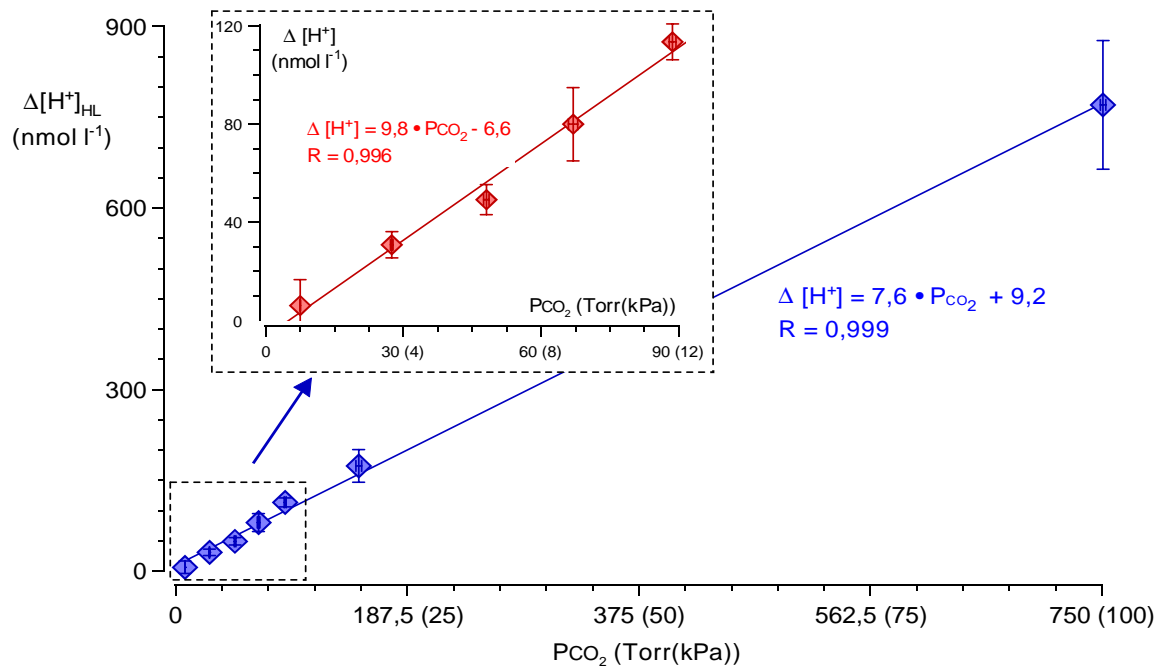


Abbildung 3.28 Änderung der Protonenkonzentration in der Hämolymphe von *Zophobas rugipes* im Puppenstadium bei Hyperkapnie. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von 4 -6 Einzelmessungen (Ausnahme bei 20 kPa: n = 2). Zwischen der Regression aller Ergebnisse (großes Diagramm) und der Werte bis 11,8 kPa (Insertion) besteht ein deutlicher Unterschied.

Aus Abb. 3.27 wird ersichtlich, dass bei Partialdrucken über 12 kPa andere Abhängigkeiten für den minimalen pH-Wert der Hämolymphe galten. Die Regressionsfunktion der Protonenkonzentrationsänderungen im Partialdruckbereich von 3,7 bis 11,8 kPa CO₂ ergibt einen Schnittpunkt mit der Abszisse bei etwa 1 kPa CO₂ (Abb. 3.28, eingefügtes Diagramm). Bringt man das Ergebnis der Nullpunktanalyse mit der Tatsache in Verbindung, dass sich bei einem atmosphärischen P_{CO_2} von 1 kPa keine Änderungen im pH-Wert der Hämolymphe messen ließen, dann läßt sich daraus schließen, dass in den Puppen, denen Elektroden implantiert wurden, ein minimaler CO₂-Partialdruck von etwa 1 kPa herrscht.

Um mögliche Veränderungen des pH-Werts während der Hyperkapniephasen zu messen, wurden die erhöhten Kohlendioxidpartialdrucke über mehrere Stunden aufrecht erhalten. Auch nach mehreren Stunden Hyperkapnie zeigten sich keine Änderungen im minimalen pH-Wert der Hämolymphe. Damit dennoch Aussagen über mögliche Kompensationsvorgänge in der Hämolymphe getroffen werden konnten, wurde es den Versuchstieren erlaubt, sich nach einer Phase der Hyperkapnie in Kohlendioxid freier Umgebungsluft zu regenerieren. Während dieser Zeit wurde gemessen, ob sich der pH-Wert nach dem Hyperkapnieversuch gegenüber dem Versuchsbeginn veränderte. Bis auf die Versuche bei 1 kPa CO₂ war im Durchschnitt ein Anstieg des pH-Werts um etwa 0,01 - 0,05 Einheiten im Vergleich zum Versuchsbeginn zu erkennen (Abb. 3.29).

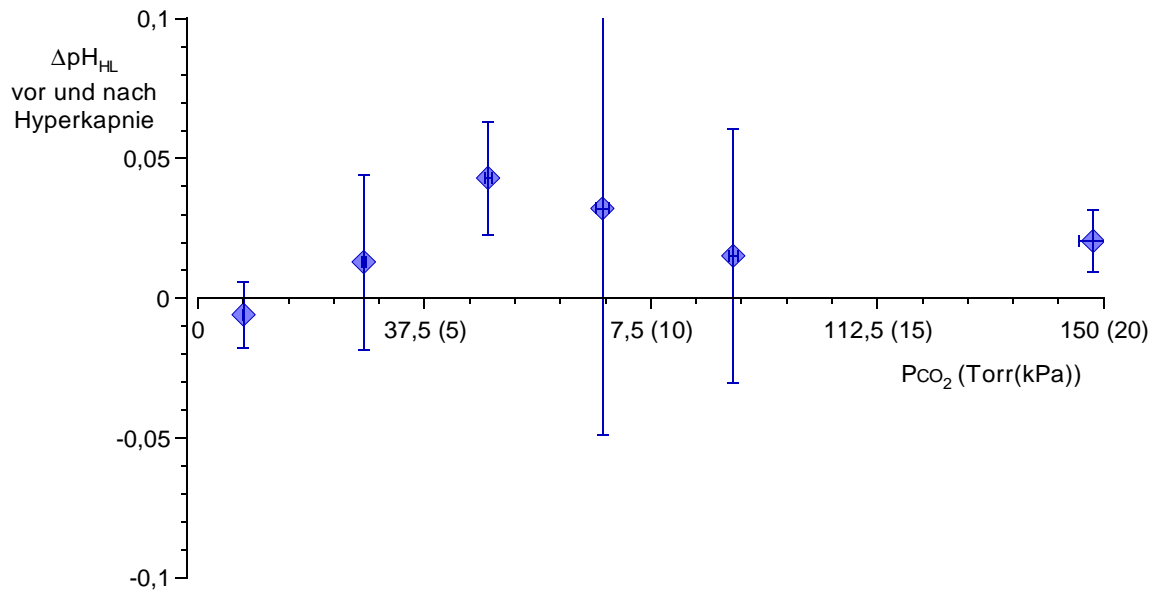


Abbildung 3.29 Differenz zwischen erreichtem pH-Wert in der normokapnischen Erholungsphase und minimalem pH-Wert des vorangegangenen Hyperkapnieversuchs in Abhängigkeit des P_{CO_2} in der Hämolymphe von *Zophobas rugipes* im Puppenstadium. Die mittlere Änderung des pH-Werts ist meist positiv, was eine verringerte Protonenkonzentration bedeutet.

Säure-Basen-Status der Hämolymphe. Da der pH-Wert der Hämolymphe gemessen wurde, konnte mit Hilfe der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung die Bikarbonatkonzentration für jeden während der Hyperkapnieversuche eingestellten P_{CO_2} berechnet werden. Der extern eingestellte P_{CO_2} entspricht dabei dem minimalen CO_2 -Partialdruck der in der Hämolymphe vorliegen kann, wenn man davon ausgeht, dass zwischen Umgebungsluft und Versuchstier ein Äquilibrium vorliegt. Die berechnete Bikarbonatkonzentration stellt demzufolge auch die geringste in der Hämolymphe vorliegende Konzentration beim entsprechenden P_{CO_2} dar.

Die Bikarbonatkonzentration wurde gegen den gemessenen pH-Wert aufgetragen und ein Pufferwert *in vivo* bestimmt. Die Ergebnisse der Berechnung wurden mit den Ergebnissen *in vitro* verglichen (Abb. 3.30). Die Bikarbonatkonzentrationen lagen *in vivo* bei gleichem CO_2 -Partialdruck deutlich niedriger als bei der *in vitro* bestimmten Funktion. Der Pufferwert der Hämolymphe *in vivo* betrug mit $37,7 \text{ meq l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$ das 2,2 fache des Pufferwerts *in vitro*.

Dieser höhere Pufferwert *in vivo* und der in Abb. 3.29 auf Seite 49 dargestellte gestiegene pH-Wert nach Beendigung des Hyperkapnieexperiments deuten auf eine metabolische Kompensation einer respiratorischen Azidose hin.

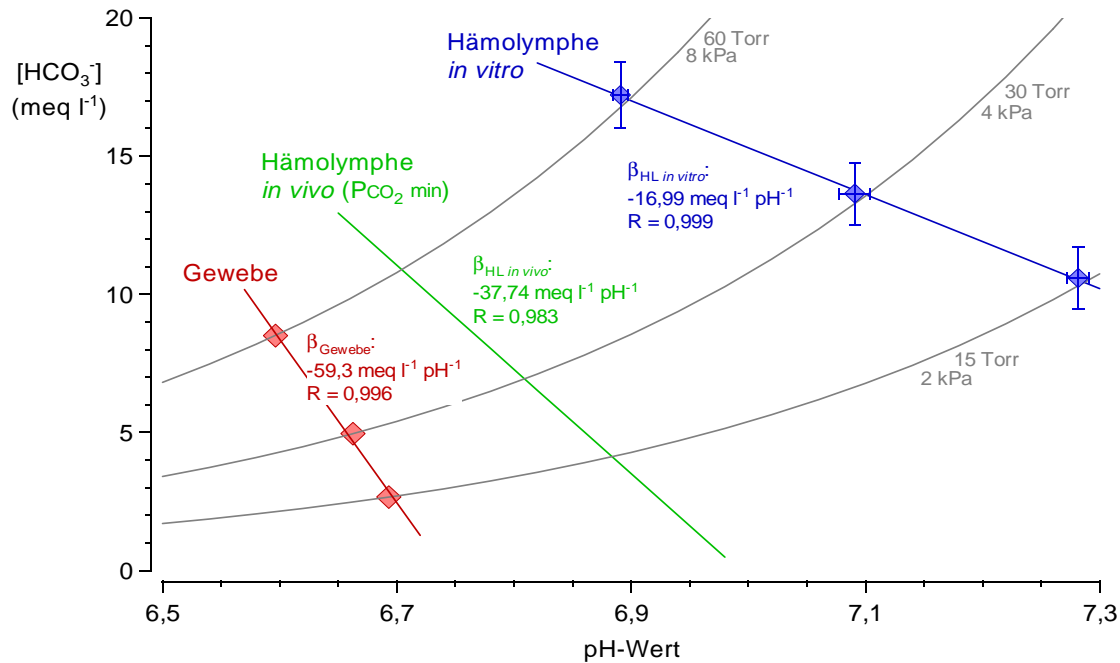


Abbildung 3.30 Abhängigkeit der Bikarbonatkonzentration vom pH-Wert in Gewebe und Hämolymphe von *Zophobas rugipes* im Puppenstadium. Die Hämolymphe *in vivo* weist einen höheren Pufferwert auf als die Hämolymphe *in vitro*.

3.20 Zusammenfassung der *in vivo* Ergebnisse

Die Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* geben Kohlendioxid zyklisch und diskontinuierlich ab. Eine Elektrodenimplantation erhöht die CO₂-Abgaberate. Als Folge verkürzt sich die Zyklusdauer auf Kosten der Interburstperiode. Die Beziehungen zwischen den Parametern der diskontinuierlichen CO₂-Abgabe (Abgaberate, Zyklusdauer, Dauer der Öffnungsperiode, Dauer der Interburstperiode, CO₂-Stoffmenge im Burst, maximale CO₂-Abgaberate im Burst) sind unabhängig von der Elektrodenimplantation.

Der in der Hämolymphe gemessene pH-Wert liegt zwischen 6,9 und 7,1. Der pH-Wert verändert sich zyklisch in Abhängigkeit von der diskontinuierlichen CO₂-Abgabe. Während der Öffnungsperiode werden Stoffmengenabgaben von 11 - 287 nmol g⁻¹ CO₂ und Zunahmen des pH-Werts von 0,006 - 0,017 Einheiten gemessen. Pro 100 nmol g⁻¹ CO₂, die in der Öffnungsperiode abgegeben werden, sinkt die Protonenkonzentration um etwa 0,016 nmol l⁻¹.

Im Hyperkapnieexperiment wird ein direkter Zusammenhang zwischen dem eingestellten CO₂-Partialdruck und dem minimalen pH-Wert der Hämolymphe festgestellt. Der pH-Wert, der in der Erholungsphase nach dem Hyperkapnieexperiment erreicht wird, liegt meistens über dem pH-Wert, der vor Beginn der hyperkapnischen Phase gemessen wird. Dies ist ein Hinweis auf eine Kompensation der respiratorischen Azidose.

Für die Kompensation spricht auch der durch den erhöhten P_{CO_2} verursachte Anstieg des Hämolymphe-Pufferwerts. Dieser beträgt mit 37,7 meq l⁻¹ pH⁻¹ im Vergleich zu dem *in vitro* bestimmten Wert von 17 meq l⁻¹ pH⁻¹ mehr als das Doppelte.

4. Diskussion

Die Messergebnisse für die Puppen von *Zophobas rugipes* werden, wenn möglich, mit Literaturwerten verglichen, die von Vertretern nahe verwandter Arten stammen. Vergleichsdaten des Mehlkäfers *Tenebrio molitor* sind aufgrund der engen verwandtschaftlichen Beziehung, der sehr ähnlichen morphologischen Strukturen und den häufig gleichen Zuchtbedingungen besonders interessant.

4.1 Versuchstiere

Zophobas rugipes eignet sich aufgrund seiner kurzen Entwicklungszeit und des geringen Pflegeaufwandes hervorragend als Objekt für eine Gesamtstadienuntersuchung. Ein besonderes Entwicklungsmerkmal dieses Käfers ist, dass er sich nur nach Isolation verpuppt. Werden die Larven in dicht besetzten Zuchtbehältern gehalten, erfolgen ausschließlich larvale Häutungen bis viele Tiere schließlich sterben [L146]. Puppen und Larven in präpupalen Ruhe werden kannibalisiert [L173]. Werden die schlupfbereiten Larven jedoch vereinzelt, erfolgt die Verpupung nach etwa neun Tagen.

Die Altersbestimmung der Puppen ist in ihrer Präzision begrenzt durch die morgens und abends durchgeführten Kontrollintervalle. Der Altersunterschied von Puppen, die als „gleich alt“ bezeichnet werden, beträgt entsprechend 12 Stunden. KROGH beschrieb für Puppen von *Tenebrio molitor*, dass die Entwicklungsdauer stark durch die Umgebungstemperatur beeinflusst wurde und von 5,5 Tagen bei 32,7 °C auf 7,2 Tage bei 27,25 °C anstieg [L104]. Obwohl die Haltungstemperatur während dieser Untersuchung im Mittel bei 29 °C ± 1,2 °C relativ konstant gehalten wurde, variierte die Dauer des Puppenstadiums von *Zophobas* bei einem Mittelwert von 9,8 Tagen um etwa 1,8 Tage. Tiere mit der selben Tagesangabe divergieren also je nach Alter und Dauer des Puppenstadiums um bis zu 10 % ihrer Entwicklungszeit. Da sich besonders zu Beginn und zum Ende des Puppenstadiums metabolische, katabolische und anabolische Prozesse verändern [L61], kann sich ein Fehler in der Altersangabe gerade in diesen Phasen auf die Ergebnisse auswirken. Eine exakte Bestimmung des Schlupfzeitpunkts sowie eine Angabe des Puppenalters in Stunden wären angebracht. Sie sind aber in der Praxis mit erheblichem technischen oder personellen Aufwand verbunden. Aus diesem Grund wurde auf exakte Altersbestimmung verzichtet. Da die Dauer des Puppenstadiums während der Versuche zwischen 9 und 11 Tagen variierte, wurden alle Altersangaben in Prozent der Dauer des Puppenstadiums angegeben, um die Ergebnisse aller Einzelversuche vergleichen zu können.

4.2 Wasserhaushalt

Gesamtwassergehalt. Der Wassergehalt von Insekten variiert von weniger als 50 % bis zu 90 % des Frischgewichts [L50]. Die Puppen von *Zophobas rugipes* enthalten etwa $58,7 \pm 1,3$ % Wasser, bezogen auf das Frischgewicht. Zwischen männlichen und weiblichen Puppen sind keine Unterschiede feststellbar. Ein derartig niedriger Wassergehalt ist bei anderen Tiergruppen pathologisch [L50], aber für Käferfamilien arider Habitate charakteristisch. So wurde bei *Opatrum rhatum* je nach Höhenlage zwischen 2600 und 3100 m ein Wassergehalt von 52,3 - 59,5 % [L58], bei *Alphitobius diaperinus* aus dem Hausmüll der Bretagne je nach Luft-

feuchtigkeit bei 0 % R.F. 58,5 % und bei 100 % R.F. 57,7 % [L155], bei den südafrikanischen Erdkäfern (Trogidae) *Omorgus sp.* und *Trox sp.* 51 - 58 % [L108] und beim wüstenbewohnenden Schwarzkäfer *Onymacris plana* 53,8 % gemessen [L130]. Der Rüsselkäfer *Calandra granaria* besteht nur zu 46 % aus Wasser [L50]. Bei Puppen von *Tenebrio* wurde ein Wassergehalt von 64 % gemessen [L25], bei Larven ca. 56 % [L84]. Im Gegensatz zu Puppen von *Zophobas* ist der Wassergehalt von Schmetterlingspuppen wesentlich höher. BRIDGES & SCHEID geben für Homogenate von *Hyalophora cecropia* (Saturniidae) einen Wassergehalt von 71,6 % an [L18]. Bei Puppen des Seidenspinners *Agapema* lag der Wassergehalt bei 72 % [L21]. WIPKING *et al.* zeigten bei Raupen von *Zygaena trifolii* (Zygaenidae), dass der Wassergehalt während der Entwicklung nicht unter 77 % sank [L185].

Eine Ursache für den unterschiedlichen Wassergehalt bei Insekten liegt im variablen Anteil an sklerotisiertem, melanisiertem und damit wasserreduziertem Chitin [L84]. Sehr weichhäutige, wenig sklerotisierte Insekten wie die Larven der Schmetterlingspuppen enthalten viel Wasser. Der Wassergehalt der stark sklerotisierten und melanisierten Schwarzkäfer ist dagegen in allen Stadien wesentlich niedriger.

Darüber hinaus ist der Wassergehalt der Insekten abhängig von der Nahrung und der Luftfeuchtigkeit. Der niedrigste Wasseranteil wird bei Käfern gefunden, die, wie auch *Zophobas*, trockene Nahrung aufnehmen [L84]. Wurden Larven von *Tenebrio* bei 10 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten, war der Wassergehalt deutlich niedriger als bei Larven in 80 % Luftfeuchte: statt 61 % ergaben sich nur noch 56 % [L124]. Der gemessene Wassergehalt der Puppen von *Zophobas* von etwa 59 % bei 30 % relativer Luftfeuchtigkeit reiht sich in diesen Bereich ein.

Es wäre zu erwarten, dass sich der Wassergehalt der Puppen bei Zuchtbedingungen mit niedriger Luftfeuchtigkeit (30 % R.F., Kapitel 2.1 auf Seite 7) im Laufe der Zeit verringert. Der Wassergehalt der Puppen von *Zophobas* bleibt aber konstant. Auch BUXTON fand, dass der Wassergehalt hungernder Käfer der Gattung *Tenebrio* trotz Gewichtsverlust konstant blieb [L24]. Eine ausgeglichene Bilanz zwischen transpirativem und respirativem Wasserverlust und metabolischem Wassergewinn könnte den konstanten Wassergehalt erklären. Die Wasserverlustrate von adulten Tenebrioniden ist sogar bei einer Luftfeuchtigkeit von 5 % extrem niedrig [L49][L50]. Dafür gibt es zwei wesentliche Gründe: zum einen besitzt die Kutikula der Tenebrioniden eine der niedrigsten Konduktanzen für Wasserdampf [L50], zum anderen sorgt der kryptonephridiale Komplex für eine effiziente Resorption von Wasser aus dem Kot. Diese Mechanismen, die auch bei Larven und Puppen zu finden sind, ermöglichen es einigen Käfern sogar, Wasserdampf aus Umgebungsluft zu resorbieren, die nicht mehr als 47 % relative Luftfeuchtigkeit aufweist [L49]. Da eine Wasseraufnahme bei 30 % relativer Luftfeuchte nicht mehr erfolgen kann, scheinen die Puppen von *Zophobas rugipes* ihren Wasserbedarf durch Metabolitwasser aus dem Fettabbau zu decken. Die Verwendung von Fetten als Energielieferant wurde durch Messung des Respiratorischen Quotienten bereits nachgewiesen [L61][L62].

Hämolymphvolumen. Die Bestimmung des Hämolymphvolumens mittels *Indikator-Dilution* erwies sich als nicht durchführbar:

Die Methode, einen Farbstoff durch Injektion in ein Kompartiment zu verdünnen, um anschließend über den Verdünnungsfaktor das Volumen des Kompartiments zu berechnen, wurde häufig praktiziert (z.B. [L109][L194], Zusammenfassung in [L5]). Allerdings muss bei einer photometrischen Messung zum einen genügend Probenvolumen vorhanden sein, zum anderen muss der Farbstoff nach der Verdünnung noch in messbaren Konzentrationen vorliegen. Aus diesem Grund mussten große Volumina an Farbstoff injiziert werden (20 µl in [L109]). Zudem wurde berichtet, dass viele der verwandten Farbstoffe Gewebe anfärben, sich also an Gewebestrukturen anheften [L194].

Sowohl die Gewinnung großer Probenvolumina als auch die Injektion großer Farbstoffvolumina ist bei *Zophobas* nicht durchführbar. Aus diesem Grund wurde mit Oregon Green[®] ein fluoreszierender Farbstoff verwandt, der gut wasserlöslich ist, durch Bindung an Dextran nicht in Zellen diffundiert und noch in geringen Konzentrationen ein gut messbares Fluoreszenzsignal liefert. Bei der anschließenden Berechnung ergaben sich allerdings Hämolymphvolumina im Umfang von etwa 60 - 100 % des gesamten Puppenvolumens, während nachfolgende Exsanguinationsversuche deutlich geringere Volumina ergaben.

Eine Fehlerquelle könnte in der Vorbehandlung des Farbstoffes durch den Hersteller liegen. Nach Angaben des Herstellers wird Dextran zunächst aminiert, dann reagieren Dextran und Oregon Green[®] zum Säureamid [L127]. Die überzähligen Aminogruppen des Polysaccharids werden durch Bindung an Schutzgruppen deaktiviert. Dieses „capping“ erfolgt nicht vollständig. Es ist möglich, dass das aminierte Dextran über verbliebene freie Aminogruppen Proteine bindet ([L40],[L126] und persönliche Mitteilung des Herstellers).

Diese Vermutung bestätigte sich in einem Kontrollexperiment, in dem der Farbstoff in eine fünfprozentige Proteinlösung (BSA) injiziert wurde (Abb. 4.1): im Laufe eines Tages wurde die Absorption des Farbstoffes in der Lösung photometrisch gemessen [G4]. Eine Reaktion von Oregon Green[®] mit Proteinen zeigte sich, wenn die Proteine mit Acetonitril denaturiert und abzentrifugiert wurden und die Absorption im Überstand gemessen wurde. Während im Kontrollversuch mit Wasser durch Acetonitrilzugabe nur ein Verdünnungseffekt auftrat, nahm die Absorption im Überstand mit der Zeit deutlich ab. Dieses Ergebnis läßt auf eine chemische Reaktion zwischen Farbstoff und Proteinen schließen, die so auch im Puppenorganismus auftreten könnte und die Menge freien Farbstoffes in der Hämolympe reduzieren würde. Proteinbindungen im Bindegewebe, an Zellmembranen und an der Kutikula würden dann zu scheinbar größerer Verdünnung führen. Eine Ankopplung des Farbstoffes an diese Proteine verringert die Konzentration des Farbstoffes in der Hämolympe und täuscht bei der Messung ein viel zu großes Hämolymphvolumen vor.

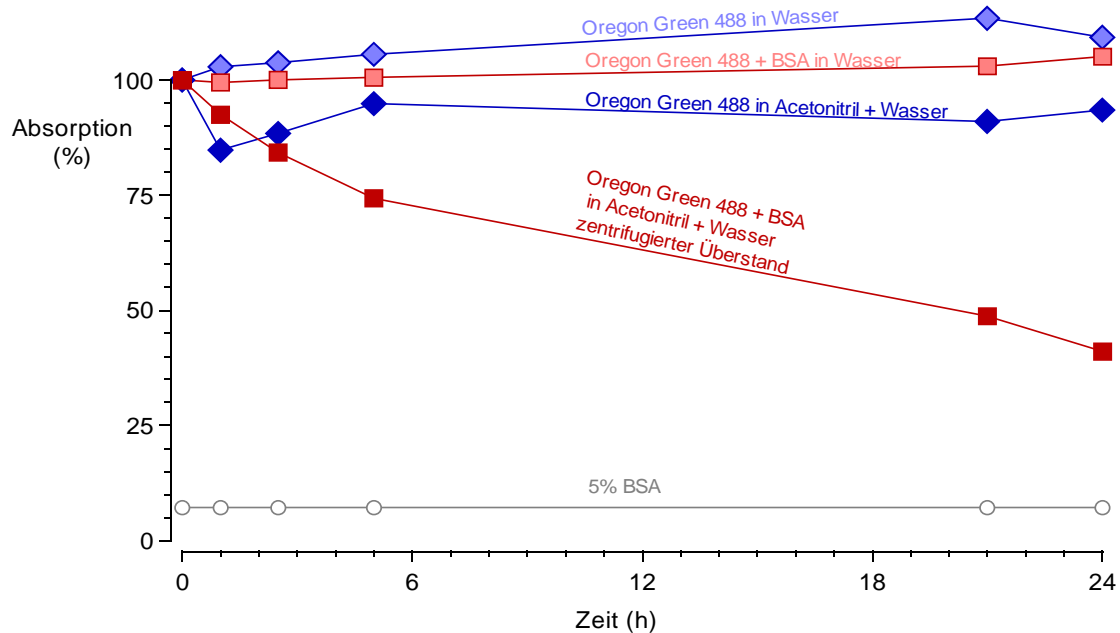


Abbildung 4.1 Absorption von Oregon Green[®] bei 494 nm in verschiedenen Lösungen in Prozent des Ausgangswerts. BSA: Proteinlösung 5 % bovines Serumalbumin. Die Lösungen, in denen BSA mit Acetonitril präzipitiert wurde, zeigen eine Abnahme der Absorption. Dies deutet auf eine Reaktion des Farbstoffes mit Proteinen hin.

Eine Alternativmethode zur Volumenbestimmung ist die Messung von ^{14}C -Inulin nach Verdünnung im untersuchten Kompartiment [L121]. Problematisch ist bei dieser Methode, dass sich das Isotop im Lauf der Zeit im Fettkörper und in Gonaden anreichert, da Inulin von Insekten metabolisiert werden kann.

Wegen der Problematik der genannten Methoden wurde das Hämolympfvolumen durch *Exsanguination* bestimmt. Diese Methode ist vor allem durch zwei Fehlerquellen belastet. Hämolymphe kann wegen starker adhäsiver Kräfte zwischen Hämolymphe und Gewebe nicht vollständig entnommen werden. Andererseits geht durch den entstehenden osmotischen Druck Wasser aus dem Intrazellularraum in den Extrazellularraum über, so dass ein Teil des Zellwassers mit entnommen wird. Da sich die bei der Exsanguination auftretenden Fehler gegenseitig kompensieren, können durchaus aussagekräftige Resultate erzielt werden. Bei RICHARDSON *et al.* wurde die als Absorptionsmethode bezeichnete Exsanguination mit der sogenannten Trockenmassenmethode verglichen [L149], bei der die Hämolymphe mit Wasser aus dem Körper herausgespült und getrocknet wird. Über die Trockenmasse der ausgespülten Hämolymphe kann das Hämolympfvolumen berechnet werden. YEAGER & TAUBER verglichen die Exsanguination mit der Verdünnungsmethode, bei der Hämocyten vor und nach Verdünnung der Hämolymphe gezählt wurden [L193]. Der Vergleich der drei unterschiedlichen Methoden zeigt gut übereinstimmende Ergebnisse.

Der mittels Exsanguination bestimmte durchschnittliche Anteil der Hämolymphe am Gesamtgewicht der Puppen von *Zophobas* beträgt 28,4 %. Da für die Dichte von Insektenhämolymphe Werte im Bereich von 1,02 [L149] bis 1,03 g ml⁻¹ [L80][L99] gemessen wurden, entspricht dies ca. 280 µl g⁻¹ Hämolymphe. Dieser Wert ist vergleichbar mit Ergebnissen von MUNSON & YEAGER, die bei Larven von *Tenebrio molitor* 220 µl g⁻¹ gemessen hatten [L129].

Nach der Verpuppung steigt das Hämolympfvolumen von 26 auf 32 % an. Danach sinkt das Volumen bis zum letzten Tag der Entwicklung. Kurz vor der Häutung zum Käfer steigt das Hämolympfvolumen nochmals deutlich um mehr als 4 %. Die Zunahme des Hämolympfvolumens nach der Verpuppung und die Abnahme bis zum letzten Tag des Puppenstadiums stehen im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Autoren. Diese beschreiben bei den Heuschrecken *Schistocerca* [L194] und *Locusta* [L121] und bei der Schabe *Periplaneta* [L193], dass das Volumen bis kurz vor jeder Larvalhäutung ansteigt, in den ersten zwei Tagen des neuen Stadiums aber rapide absinkt.

Während alle diese Arten aus der Gruppe der hemimetabolen Insekten stammen, die im Laufe ihrer Entwicklung ein graduelles Wachstum aufweisen, erfolgt bei holometabolen Insekten im Puppenstadium ein mehr oder weniger starker Umbau der Gewebe. Da die Histolyse hauptsächlich im mittleren Zeitabschnitt des Puppenstadiums stattfindet, scheint die Vergrößerung des Hämolympfvolumens durch die Bestandteile des aufgelösten Gewebes verursacht worden zu sein. Die Abnahme des Volumens zum Ende des Puppenstadiums weist auf die Verschiebung von Flüssigkeit in die neu aufgebauten imaginalen Gewebe hin. Die Zunahme des Hämolympfvolumens kurz vor dem Schlüpfen des adulten Käfers fällt zeitlich mit der Absorption der Exuvialflüssigkeit aus dem Spalt zwischen alter und neuer Kutikula zusammen. Die Ausbildung der imaginalen Körperhülle beginnt etwa mit dem sechsten Tag der Puppenentwicklung und ist am vorletzten Tag abgeschlossen. Der zu dieser Zeit noch prall gefüllte Exuvialspalt ist kurz vor dem Schlüpfen vollständig geleert.

Die positive Korrelation zwischen Wassergehalt und Hämolympfvolumen bei Larven des Tenebrioniden *Onymacris marginipennis* [L36] trifft nicht für die Puppen von *Zophobas* zu. Die Ergebnisse sind viel mehr mit denen des Käfers *Onymacris plana* vergleichbar, bei dem der Wassergehalt trotz Dehydrierung und sinkendem Hämolympfvolumen konstant blieb [L130].

Die Änderungen von Hämolympf- und Gewebevolumina können durch Flüssigkeitsverschiebungen zwischen den Kompartimenten erklärt werden. Dabei muss der Exuvialspalt als zusätzliches Kompartiment bei der Betrachtung von Wasserverschiebungen berücksichtigt werden. Ob die Veränderungen des Hämolympfvolumens während der Puppenentwicklung von *Zophobas* eine Form der Regulation darstellen, ist nicht eindeutig feststellbar. Es ist wahrscheinlicher, dass die Hämolymphe als Reservoir für das während der Histolyse freiwerdende Gewebewasser und für die Flüssigkeit des Exuvialspalts dient.

4.3 Inhaltstoffe

Anorganische Kationen. Die Bestimmung von Kationenkonzentrationen mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie wird standardmäßig durchgeführt. Solange gewährleistet ist, dass die Konzentrationen in den Proben innerhalb des linearen Messbereichs des Geräts liegen, sind die Werte zuverlässig bestimmbar. Wichtigste Voraussetzung dafür ist die Verwendung präziser Dilutoren, mit denen man in der Lage ist, exakte Verdünnungsreihen herzustellen. Da die Proben besonders leicht durch Natrium kontaminiert werden, müssen für präzise Messungen extrem saubere Probengefäße und hochreine Lösungsmittel und Additive verwandt werden. Durch die Zugabe der Additive werden Nebeneffekte wie Ionisierung oder Komplexbildung wirksam unterbunden [L184]. Ein Nachteil der Methode besteht darin, dass nicht die Aktivität

der Ionen, sondern deren Konzentration bestimmt wird. Chemische und osmotische Aktivität können damit nicht untersucht werden.

Der Gehalt anorganischer Kationen in der Hämolymphe von Insekten variiert in weiten Grenzen und scheint keine systematische oder stadienspezifische Einordnung zuzulassen [L54][L94]. BONÉ kam in seiner Arbeit zu dem Ergebnis, dass alle herbivoren Insekten ein hohes, alle Karnivoren ein niedriges Verhältnis von Kalium- zu Natriumkonzentration in der Hämolymphe besitzen. Die Relation bei den Omnivora liegt intermediär [L17]. SUTCLIFFE zeigte später, dass diese Einteilung für aquatische Insekten nicht zutrifft [L167]. Das Kationenmuster ist vielmehr spezifisch für verschiedene Ordnungen [L168]. Daneben gibt es vor allem bei den Käfern stark abweichende Ausnahmen, die als Spezialisierung diverser Arten gesehen werden könnten [L43]. Die Ursachen für diese Divergenz bleiben weiterhin ungeklärt. Trotz der abweichenden Meinungen fügt sich der Natrium-Kalium-Quotient der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas rugipes* gut in das von BONÉ erstellte Schema ein, solange man terrestrische Insekten betrachtet (Abb. 4.2). Die Hämolymphe von *Zophobas* besitzt mit einer durchschnittlichen Kaliumkonzentration von $24,2 \pm 4,2 \text{ meq l}^{-1}$ und einer durchschnittlichen Natriumkonzentration von $56,9 \pm 3,5 \text{ meq l}^{-1}$ eine Na^+ / K^+ -Relation von 2,4. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Verhältnis von 1,9 bei *Tenebrio molitor* [L17]. In einer späteren Arbeit wurde bei *Tenebrio molitor* eine Kaliumkonzentration von $36,5 \text{ meq l}^{-1}$ und eine Natriumkonzentration von $75,5 \text{ meq l}^{-1}$ gemessen (Quotient 2,1 [L12]).

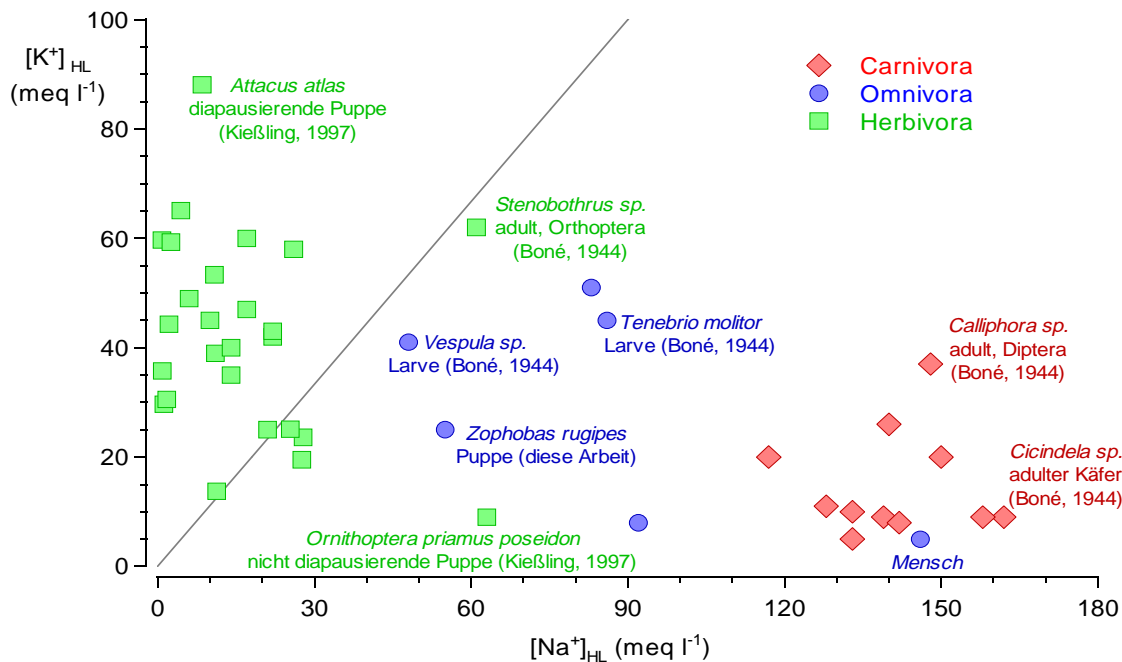


Abbildung 4.2 Natrium-Kalium-Korrelation in der Hämolymphe einiger Insektenarten im Vergleich zum Blutplasma des Menschen unter Beachtung der Ernährungsweise. Herbivore, omnivore und karnivore Insekten unterscheiden sich durch einen steigenden Natrium-Kalium-Quotienten. Die Gerade stellt die Iso-konzentrationslinie dar. Ein Symbol entspricht einer Art. Daten aus [L17][L26][L36][L99][L138][L171].

Auch die Konzentrationen von Calcium und Magnesium sind art- und stadienspezifisch und korrelieren mit der Ernährungsweise (Ca^{2+} : 5,2 - 41 meq l^{-1} ; Mg^{2+} : 1 - 184 meq l^{-1} [L35]).

Für Coleoptera werden Werte von 19 meq l^{-1} für Calcium und 48 meq l^{-1} für Magnesium angegeben [L139]. Die mit durchschnittlich 4 meq l^{-1} sehr niedrige Calciumkonzentration in der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas* liegt am unteren Ende der bisher gemessenen Werte. Die Magnesiumkonzentration liegt dagegen mit 51 - 83 meq l^{-1} im Bereich der bisher erhobenen Daten anderer Käferarten. Die Konzentrationen der divalenten Ionen werden bei Insekten häufig durch die Zusammensetzung der Nahrung bestimmt.

Die Magnesiumkonzentration sinkt kontinuierlich von 83 meq l^{-1} auf 51 meq l^{-1} bis 60 % der Puppenentwicklung durchlaufen sind. Anschließend bleibt die Konzentration stabil. Magnesium wird offensichtlich bis zu dem Zeitpunkt aus der Hämolymphe in Gewebe transportiert, zu dem in der Puppe die Vorbereitungen zur Imaginalhäutung beginnen. Entweder dient das Kation dann als Elektrolyt zur Osmoregulation, als Kofaktor für Enzyme oder als komplexierendes Ion für Proteine der Kutikula.

Die Konzentrationen der anderen Kationen weisen Schwankungen auf, die statistisch nicht relevant sind. Diese sind daher als konstant anzusehen.

Chlorid. Die Messung des Chloridgehalts erfolgte coulometrisch durch Titration des Chlorids mit Silberionen. Diese Methode eignet sich wegen der quantitativ ablaufenden Reaktion, des geringen Probenvolumens und der hohen Spezifität sehr gut zur Bestimmung der Chloridkonzentration in Insekten. Die Titration des Chlorids kann durch einen hohen Anteil von Proteinen gestört werden [L4]. NaCl - Standards mit 64,1 g l^{-1} Hämoglobin ergaben im Durchschnitt ca. 6 mmol l^{-1} höhere Chloridkonzentrationen als entsprechend deproteinisierte Proben. Die Autoren führen als Ursache eine mögliche Reaktion der Silberionen mit SH-Gruppen der Proteine an. Gelatinelösung, die der Titrationslösung zugegeben wird, soll die Proteininteraktion verhindern (HEISLER, persönliche Mitteilung). Um den Effekt der Proteine auf die Messung zu prüfen, wurde die Hämolymphe von vier Tieren gesammelt und ein Teil mit Acetonitril deproteinisiert. Nach Abzentrifugieren wurde die Chloridkonzentration des proteinfreien Überstandes ermittelt. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen Proben mit oder ohne Proteinen.

Chlorid ist das Hauptanion in den extrazellulären Kompartimenten vieler Tiere. Die Chloridkonzentration in der Hämolymphe von Insekten unterscheidet sich art- und stadienspezifisch. Eine der ersten Messungen stammt aus dem Jahr 1927, bei der für den Gelbrandkäfer *Dytiscus* 63,3 meq l^{-1} , bei Puppen von *Sphinx* 15 meq l^{-1} Chlorid gemessen wurden [L141]. SUTCLIFFE stellte fest, dass bei Exopterygota ein hoher, bei Endopterygota ein niedriger Chloridanteil vorliegt [L168]. Die Chloridkonzentration bei *Zophobas* betrug zu Beginn des Puppenstadiums ca. 78 meq l^{-1} , und sank zum Ende auf Werte um 65 meq l^{-1} . Larven derselben Familie besitzen einen weit größeren Chloridgehalt: bei *Onymacris marginipennis* wurden je nach Hydratisierungszustand 104 - 182 meq l^{-1} [L36], bei *Tenebrio molitor* 130 - 163 meq l^{-1} gemessen [L12]. Ob die Puppen dieser Arten ähnlich hohe Chloridkonzentrationen aufweisen, ist noch zu klären.

Physiologische Relevanz des Ionenmusters. Die ionale Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Membranruhepotenzials und der Aktionspotenziale von Nerven und Muskeln. Bei Wirbeltieren entspricht die extrazelluläre Flüssigkeit dem Blutserum. Zwischen dem Ionenmuster des Blutserums und der Hämolymphe

bestehen erhebliche Unterschiede. Ein Neuron oder eine Muskelzelle eines Wirbeltieres, die von Hämolymphe umgeben wären, könnten nicht funktionieren. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Hämolymphe nicht die extrazelluläre Flüssigkeit der Gewebe darstellt.

Um das 'milieu exterieur' des Nervensystems abzugrenzen, besteht bei den Wirbeltieren eine Blut-Hirn-Schranke, die den Stoffaustausch zwischen Blut und Liquor kontrolliert. Erste Hinweise auf eine ähnliche Struktur bei Insekten fand ROEDER bei Schaben: Änderungen der Kalium-, Calcium- oder Dextrosekonzentration in Salzlösungen hatte erst nach über zehn Stunden Auswirkungen auf die Spontanaktivität isolierter Nervenstränge in der Lösung [L151]. Später fand man Hinweise für eine aktive, ionensperrende Hülle um das Nervengewebe [L175]. Die Nerven der Heuschreckenart *Locusta* ertragen externe Kaliumkonzentrationen bis 70 meq l^{-1} , solange die perineurale Hülle intakt bleibt. Ein Entfernen der Hülle führt zur spontanen Depolarisation [L87]. Morphologische Untersuchungen zeigen, dass sich um die zentralen und peripheren Teile des Nervensystems von Insekten eine bindegewebige Hülle legt, die Neurilemm genannt wird. Sie überzieht auch die intraepidermal gelegenen Sinneszellen. Oft kann eine innere zellige Lage, das Perineurium und eine äußere homogene, wahrscheinlich kollagenfaserhaltige Lage, die Neurallamelle unterschieden werden [L182]. Die 'Blut-Hirn-Schranke' der Insekten trennt den Extraneuralraum effizient von der Hämolymphe [L106].

Die innervierenden Axone sind bis an den Kontaktort der Organe vom Perineurium umgeben [L89]. Muskel, Herz, Malpighische Gefäße oder Fettkörper liegen frei in der Hämolymphe, die in diesem Fall das extrazelluläre Medium darstellt. Eine besondere Situation ergibt sich dabei für das Muskelgewebe, dessen Ruhe- und Aktionspotenzial vom Verhältnis zwischen innerer und äußerer Ionenkonzentration abhängt. In vielen Experimenten wurde die Abhängigkeit der Muskelmembranpotenziale von der Konzentration der Ionen in der Hämolymphe untersucht [L42][L139][L177]. BELTON fand, dass das Ruhemembranpotenzial in Muskelzellen des Mondspinners *Actias selene* in zwei verschiedenen Kaliumlösungen (10 und 50 meq l^{-1}) zwischen -40 und -65 mV betrug [L11]. So niedrige Membranpotenziale wären bei Geweben von Wirbeltieren nicht vereinbar mit einer regenerativen Antwort oder einer mechanischen Kontraktion [L119]. Bei Insekten erfolgen die Kontraktionen jedoch noch in hochkonzentrierten Kaliumlösungen ohne dass ein Aktionspotenzial entlang der Muskeloberfläche messbar wäre [L66][L89].

Dafür gibt es zwei Gründe. Zum einen sorgen multipolare Endplatten für eine fast unverzügliche Depolarisation der gesamten Einheit, sodass eine Konduktion über die Muskeloberfläche nicht mehr notwendig ist. Zum anderen sind die Muskelzellen durch die Basalmembran und das transversale tubuläre System von der Hämolymphe abgeschirmt. Durch aktive Transportprozesse kann im tubulären System die Ionenzusammensetzung erzeugt werden, die für die Funktion der Muskeln notwendig ist [L139][L177]. Daher ist das Potenzial zwischen Muskelzellen und Hämolymphe für die Funktion des Muskels nicht relevant.

Insektenmuskeln erzeugen wie das Nervensystem ihre eigene extrazelluläre Umgebung. Diese Eigenschaft ermöglicht ihnen, die Zusammensetzung der Hämolymphe zu variieren. Das Ionenmuster in der Hämolymphe der Insekten ist also für die neuronalen und muskulären Signalfunktionen kaum von Bedeutung. Vielmehr spiegelt das Muster einen Status des Entwicklungs-, Ernährungs- und Stoffwechselzustands wider.

Proteingehalt. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte photometrisch nach der Methode von LOWRY [L122]. Zuvor wurden die Proteine mit Acetonitril denaturiert und abzentrifugiert. Das getrocknete Präzipitat wurde aufbereitet und für die Messung verwandt.

Bei der Fällung mit Acetonitril wird die Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst. Dies erfolgt erst in einer Lösung, die mehr als 50 % Acetonitril enthält [L59]. Die Denaturierung der Proteine ist reversibel: verdünnt man eine Lösung, in der α -Chymotrypsin durch Acetonitril denaturiert wurde, erhält man wieder die volle enzymatische Aktivität [L131]. Die Sekundärstruktur der Proteine wird nicht beeinträchtigt, Autolyseprozesse treten nicht auf. Das bedeutet, dass der nach der Zentrifugation des Proteinpräzipitats gewonnene Überstand keine aus den Proteinen abgespaltenen Aminosäuren enthält. Der Überstand kann also für die Bestimmung der freien Aminosäuren verwandt werden. Enthaltenes Acetonitril wird durch Verdampfen rückstandsfrei entfernt. Anders als bei Verwendung von Trichloressigsäure oder Perchloressigsäure zur Denaturierung müssen die Proben nach der Fällung nicht neutralisiert werden.

Die Proteinbestimmung nach LOWRY ist eine Weiterentwicklung der weniger sensitiven Biuretmethode [L122]. Bei der Reduktion eines Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenzes durch einen Kupfer-Protein-Komplex entsteht eine intensive Blaufärbung. Über die Spezifität des Nachweises finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben: nach COOPER erfolgt bei der Methode nach LOWRY die Komplexierung über Peptidbindungen der Proteine [L34]. Die Zusammensetzung der Proteine wäre demzufolge irrelevant. Nach LOTTSPEICH & ZORBAS erfolgt der Nachweis nach LOWRY durch Komplexierung mit den Seitengruppen organischer Aminosäuren [L120]. Eine unterschiedliche Zusammensetzung der Proteine hätte dann Auswirkungen auf die gemessene Proteinkonzentration. Beim Vergleich von Aminosäurespektren verschiedener Proteine zeigt sich, dass die Häufigkeitsverteilung der organischen Aminosäuren meist sehr ähnlich ist [L176]. Aus diesem Grund wurde trotz möglicher Fehlerquellen BSA als Standardprotein für die Quantifizierung der Insektenproteine verwandt.

Die Reaktion wird durch Trispuffer gestört, der in der Wirbeltierphysiologie häufig verwendet wird. Starke Reduktionsmittel, wie Mercaptane, reduzieren die Kupferionen des LOWRY-Reagenzes und erzeugen einen roten Niederschlag [L34]. Da Trispuffer nicht zum Einsatz kamen und starke Reduktionsmittel in der Hämolymphe der Insekten nicht gefunden wurden, ist eine Verfälschung der Ergebnisse nicht zu erwarten.

Die Proteinkonzentration der Insektenhämolymphe unterscheidet sich bei verschiedenen Arten beträchtlich. In der Literatur finden sich Werte von 10 - 100 g l⁻¹ [L123]. In der Hämolymphe von Schmetterlingspuppen finden sich im allgemeinen sehr hohe Proteinkonzentrationen: beim Seidenspinner *Telea polyphemus* wurden 81 g l⁻¹ [L26], bei *Attacus*, *Ornithoptera* und *Acherontia* Werte zwischen 30 und 100 g l⁻¹ gemessen [L99]. In der Hämolymphe von Käfern liegen geringere Konzentrationen vor: FLORKIN gab den Proteingehalt des Käfers *Hydrophilus piceus* mit 20 g l⁻¹ an [L53]. Puppen von *Zophobas* besitzen im Vergleich zu anderen Käfern mit 38 - 57 g l⁻¹ eine relativ hohe Proteinkonzentration.

Angaben über den Verlauf der Proteinkonzentration während der Entwicklung finden sich selten in der Literatur. Bei Larven des Windenschwärmers *Agrius convolvuli* nimmt die Konzentration der Speicherproteine vom Arylphorintyp während der Entwicklung ab [L154]. Während der zwölfwägigen Puppenentwicklung sinkt er von 20 g l⁻¹ auf 0 g l⁻¹. Ob sich der

Gesamtproteingehalt ebenfalls ändert, bleibt ungeklärt [L162]. Der Proteingehalt der Fliege *Phormia regina* steigt während der larvalen Entwicklung auf 19 g l^{-1} , sinkt bei der Häutung zur Puppe auf 13 g l^{-1} ab und bleibt dann während des Puppenstadiums unverändert [L30]. Bei Puppen des Schwärmers *Protoparce quinquemaculata* erhöht sich die Proteinkonzentration in der Hämolymphe in den ersten acht Tagen des Puppenstadiums, gefolgt von einer Abnahme bis zum pharaten Adulttier [L92]. Beim Seidenspinner *Bombyx mori* steigt die Proteinkonzentration während der Raupenphase auf 58 g l^{-1} , während der folgenden Puppenphase sinkt die Konzentration kontinuierlich auf 26 g l^{-1} ab [L53]. Dieses Ergebnis lässt sich am ehesten mit dem in dieser Arbeit gefundenen vergleichen:

Bei *Zophobas* nimmt die Proteinkonzentration während der Puppenentwicklung ab. Nachdem ein Maximalwert von 57 g l^{-1} nach etwa 30 % der Entwicklungszeit erreicht wird, sinkt die Konzentration kontinuierlich auf 38 g l^{-1} . Aufgrund der hohen Standardabweichung sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Ein Grund für die große Streuung liegt in der Methode selbst begründet. So ergeben sich bei Mehrfachmessungen des Standards Streuungen von ca. 10 %. Die großen Abweichungen der Hämolympfproben lassen jedoch noch andere Ursachen vermuten. In früheren Arbeiten wurden Unterschiede in den Proteinfractionen zwischen männlichen und weiblichen Scarabaeiden gefunden [L164]. Oft besitzen weibliche Puppen und Adulti einen höheren Proteinspiegel in der Hämolymphe als männliche [L99]. Dies liegt unter anderem an ihrer gesteigerten Proteinproduktion bei der Vitellogenese [L54]. Da in dieser Arbeit bei der Proteinbestimmung nicht nach Geschlecht getrennt wurde, könnten dadurch größere Streuungen entstehen.

Aminosäuren. Bei der Aminosäurebestimmung sind zwei Kriterien von Bedeutung: Trennung und Detektion. Aminosäuren können durch Fällungsreaktionen, mikrobiologische Assays oder Papierchromatographie analysiert werden. Diese Methoden sind störungsanfällig und manche Aminosäuren können nicht separiert oder nicht detektiert werden [L143]. Eine quantitative Analyse ist nicht durchführbar [L2]. Erst seit der Entwicklung der HPLC ist eine schnelle, präzise Trennung aller Aminosäuren möglich.

Für die Detektion werden die Aminosäuren meistens an einen Farbstoff gekoppelt. In dieser Arbeit wurde dafür DABS-Cl verwandt [L179]. Ein anderer, häufig verwandter Farbstoff zur Detektion der Aminosäuren ist ortho-Phthalaldehyd (OPA). DABS-Cl hat gegenüber OPA zwei Vorteile: es reagiert mit allen Aminosäuren (OPA reagiert nicht mit Prolin) und die Derivate sind bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für mehrere Monate stabil [L37].

Die Derivatisierung der Aminosäuren vor dem Trennungsvorgang hat den Vorteil, die Derivate nach der Trennung ohne Verzögerung zu erfassen. Dadurch werden Schwankungen der Basislinie, Verdünnungseffekte und Kontaminationen vermieden. Die Sensitivität der Methode ist hoch: das Signal-Rausch-Verhältnis liegt bei 5 - 10 [L28]. Die Nachweisgrenze einzelner Aminosäuren beträgt $0,5 - 1 \text{ pmol}$.

Die Aminosäurekonzentration in der Insektenhämolymphe ist höher als in der Hämolymphe oder im Plasma anderer Tiere. Im Blutplasma des Menschen beträgt sie etwa $2,6 \text{ mmol l}^{-1}$, bei der Forellenart *Oncorhynchus gorboscha* etwa $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$. Bei Insekten reicht die gemessene Aminosäurekonzentration von $20,3 \text{ mmol l}^{-1}$ bei der Stabheuschrecke *Carausius morosus* bis zu 153 mmol l^{-1} bei diapausierenden Puppen des Schwärmers *Antheraea pernyi*.

COUTCHÉ & CROWE untersuchten mit Larven von *Onymacris marginipennis* einen Vertreter der Tenebrioniden [L36]. Sie fanden Konzentrationen von 45 - 57 mmol l⁻¹. Die Aminosäurekonzentration in der Puppenhämolymph von *Zophobas* ist mit mittleren 40 mmol l⁻¹ vergleichbar hoch.

Der Aminosäuregehalt der Hämolymph einer Insektenart hängt vom Entwicklungszustand, von der Jahreszeit und vom Geschlecht ab. Bei der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* ändert sich die Konzentration im Laufe der Entwicklung. Der neuseeländische Weta *Hemideina maori*, eine Zikadenart, hat im Winter eine Aminosäurekonzentration von 263 mmol l⁻¹, im Sommer 58 mmol l⁻¹ [L147]. Frisch geschlüpfte Männchen des Käfers *Antonomus grandis* haben mit 55,1 mmol l⁻¹ weniger Aminosäuren im Blut als Weibchen mit 67,9 mmol l⁻¹. Nach fünf Tagen sind die Verhältnisse umgekehrt. Die freien Aminosäuren haben bei den Weibchen auf 29 mmol l⁻¹ abgenommen, während in der Hämolymph der Männchen noch 38,2 mmol l⁻¹ zu finden sind [L125].

Bei den Puppen von *Zophobas* unterliegt die Aminosäurekonzentration der Hämolymph entwicklungsbedingten Schwankungen. Jahreszeitliche Unterschiede sind aufgrund der stets konstanten Zuchtbedingungen nicht zu erwarten. Die niedrigste Konzentration wurde mit 30,7 mmol l⁻¹ nach 20 % der Entwicklungszeit gemessen. Das Maximum betrug 54,7 mmol l⁻¹ nach 60 % der Entwicklungszeit. Danach sank die Konzentration wieder auf 38,6 mmol l⁻¹ ab. Die geringen Aminosäurekonzentrationen zu Beginn und am Ende der Entwicklung fallen zeitlich mit den Tagen des größten Sauerstoffverbrauchs zusammen [L61][L62]. Wie PATTERSON bei *Tenebrio molitor* festgestellt hat, korrespondieren die Perioden intensiver Aminosäureoxidation mit den Peaks der U-förmigen Sauerstoffverbrauchskurve und mit den Aktivitätskurven verschiedener Aminosäuredehydrogenasen. Die maximale Deaminaseaktivität scheint zu derselben Zeit aufzutreten. In den Phasen geringerer Stoffwechselaktivität wird der Aminosäurepool aufgefüllt [L135].

Jede Insektenart besitzt ein eigenes Muster von Aminosäuren in der Hämolymph [L44]. Untersuchungen an verschiedenen Völkern der Honigbiene *Apis mellifera* belegen dies [L37]. Selbst zwischen Arbeiterinnen und Drohnen eines Bienenvolkes bestehen große Unterschiede [L110]. Folglich muss das Aminosäuremuster stadienspezifisch für einen definierten Entwicklungs- und Ernährungszustand und für definierte äußere Bedingungen analysiert werden.

Die Aminosäuren Aspartat und Glutamat fehlen in der Puppenhämolymph von *Zophobas*, wie bei den Arbeiterinnen der Honigbienen [L37]. Aspartat wird zu Oxalacetat umgesetzt und in den Trikarbonsäurezyklus eingeschleust. Glutamat ist Substrat zur Bildung von α -Ketoglutarat (Synonym: 2-Oxoglutarat). In Zellkulturen von *Spodoptera frugiperda* wurde nachgewiesen, dass beide Aminosäuren in diesen Reaktionen signifikant abgebaut werden. Der Umbau anderer Aminosäuren zu Aspartat und Glutamat erfolgt dagegen langsamer [L52]. Dies kann den fehlenden Nachweis von Aspartat und Glutamat erklären. Die in früheren Arbeiten gefundenen hohen Konzentrationen von Glutamat wurden vermutlich durch bei der Probenaufbereitung lysierte Hämocyten verursacht [L148][L176].

Die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein sind in den Puppen nicht oder nur in Spuren vorhanden. Beide Aminosäuren sind essentiell und werden bei Insektentuppen häufig verwandt, um Taurin aufzubauen, das in die neugebildete Flugmuskulatur eingelagert wird ([L16] zitiert in [L176]). Da Taurin ebenfalls durch DABS-Cl derivatisiert wird [L28], wäre

eine Detektion bei der Aminosäure-Analyse möglich. Das Derivat besitzt eine ähnliche Retentionszeit wie Asparagin [L28]. Da in dieser Arbeit bei der Detektion alle Peaks eindeutig zugeordnet werden konnten, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass Taurin nicht vorhanden war. Das bedeutet, dass die schwefelhaltigen Aminosäuren zum größten Teil bereits in Proteine eingebaut worden sind, bevor die Metamorphose zur Puppe vollzogen war.

Im folgenden werden die Konzentrationsänderungen einzelner Aminosäuren diskutiert. Dazu werden die Änderungen von einem auf den folgenden Tag der Puppenentwicklung in Hämolymphe und Gewebe berechnet. Die Berechnungen basieren auf den gemessenen Ergebnissen für die Hämolymphe (Tabelle 6.9 auf Seite 116) und den berechneten Ergebnissen für das Gewebe (Tabelle 6.11 auf Seite 119). Die Änderungen können nicht allein durch die Volumenänderung der Hämolymphe, also einen Konzentrierungs- oder Verdünnungseffekt erklärt werden. Dafür ist die Volumenänderungen zu gering oder die Konzentrationen verändern sich mit anderem Vorzeichen.

Die Konzentration von Leucin im Gewebe sinkt in den ersten Tagen des Puppenstadiums (Abb. 4.3). Leucin wird zu Acetoacetat und Acetyl-CoA umgebaut und dient somit als Substrat zur Energiegewinnung [L165]. Nach 5 Tagen oder 40 % der Puppenentwicklung steigt die Konzentration in Gewebe und Hämolymphe. Da Leucin als essentielle Aminosäure nicht *de novo* synthetisiert werden kann, ist zu vermuten, dass die steigende Konzentration durch eine Freisetzung aus dem Abbau von Proteinen, beispielsweise Arylphorinen zustande kommt [L162].

Die Konzentration von Lysin steigt bis zur Mitte des Puppenstadiums auf hohe Werte an und sinkt im weiteren Verlauf der Entwicklung wieder ab (Abb. 4.3). Die essentielle Aminosäure wird vermutlich zu Beginn der Entwicklung aus Proteinen freigesetzt und später in Proteine eingebaut oder zu Acetyl-CoA abgebaut und zur Energieproduktion genutzt [L165].

Serin und Glycin werden zu Beginn des Puppenstadiums zunächst aus Gewebe und Hämolymphe entfernt (Abb. 4.3). Beide Aminosäuren können zu Pyruvat umgebaut werden und so in den Energiestoffwechsel gelangen. Die Erhöhung der Konzentration erfolgt wie bei Lysin während der Phase geringeren Stoffwechsels [L135]. Steigt der Stoffwechsel wieder an, werden die Aminosäuren wieder zur Energiegewinnung verwandt oder in Proteine eingebaut. Dafür spricht, dass beide Aminosäuren in großen Konzentrationen in Proteinen von Insekten nachgewiesen wurden [L170].

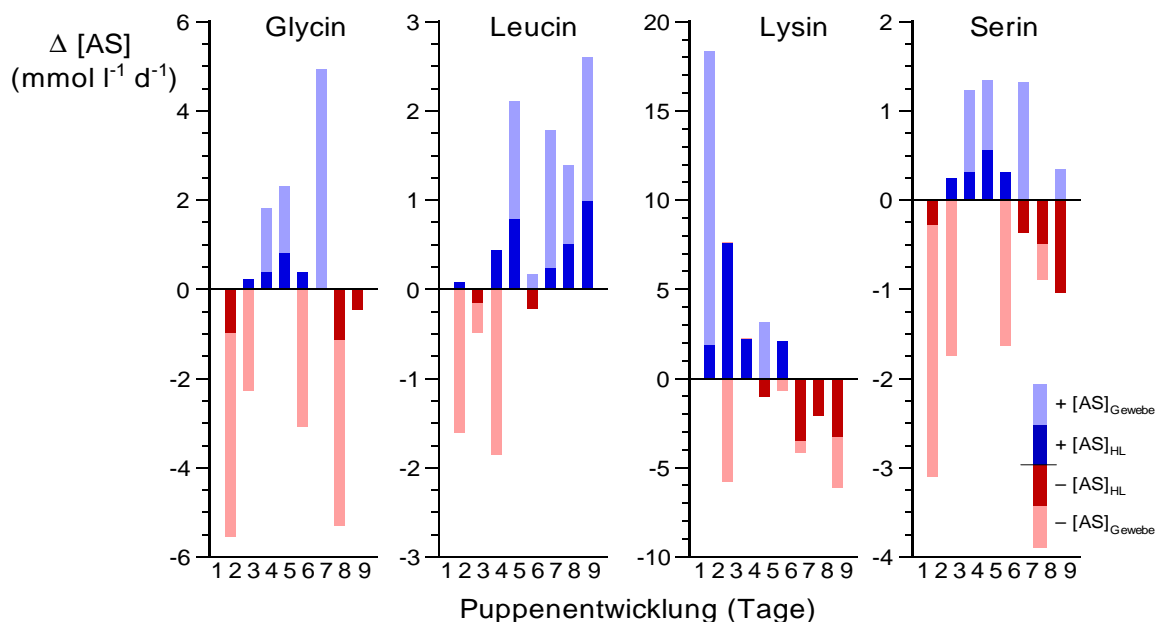


Abbildung 4.3 Konzentrationsänderungen von Glycin, Leucin, Lysin und Serin in der Hämolymphe (dunkel) und im Gewebe (blass) während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die Änderungen wurden von einem Tag der Puppenentwicklung auf den nächsten berechnet. Zunahmen der Konzentration sind in positiver, Abnahmen in negativer Richtung an der Ordinate aufgetragen. Die Ordinaten sind unterschiedlich skaliert.

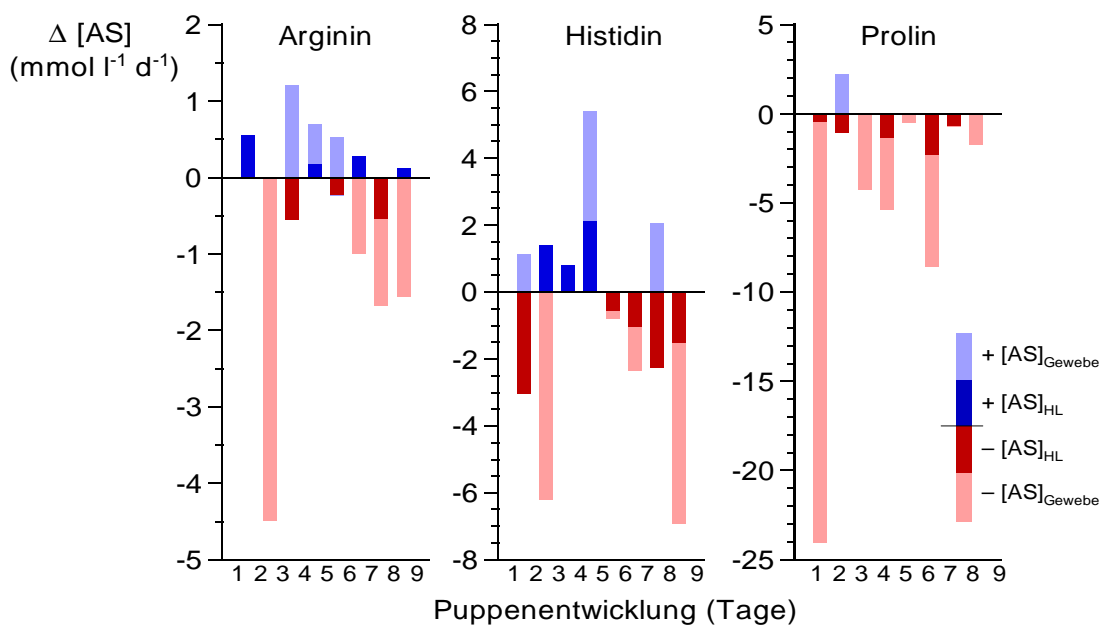


Abbildung 4.4 Konzentrationsänderungen von Arginin, Histidin und Prolin in der Hämolymphe (dunkel) und im Gewebe (blass) während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die Änderungen wurden von einem Tag der Puppenentwicklung auf den nächsten berechnet. Zunahmen der Konzentration sind in positiver, Abnahmen in negativer Richtung an der Ordinate aufgetragen. Die Ordinaten sind unterschiedlich skaliert. Alle drei Aminosäuren dienen als Energielieferanten und werden über Glutamat und α -Ketoglutarat in den Trikarbonsäurezyklus eingeschleust. Sie zeigen zu Beginn und zum Ende der Entwicklung deutliche Konzentrationsabnahmen.

Prolin tritt bei Insekten häufig in hohen Konzentrationen auf [L36][L133][L147]. Der höchste bisher gemessene Wert in der Hämolymphe beträgt 170 mM bei der Tsetsefliege *Glossina morsitans* [L176]. Diese Aminosäure hat im Stoffwechsel der Insekten eine große Bedeutung, denn sie kann über Glutamat und α -Ketoglutarat in den Trikarbonsäurezyklus eingeschleust werden [L142]. Prolin wird deswegen von vielen fliegenden Insekten als Energielieferant verwandt. Der südafrikanische Rosenkäfer *Pachnoda sinuata* nutzt Prolin beispielsweise für die Aufwärmphase vor dem Flug [L7]. Neben Prolin können auch Histidin und Arginin über Glutamat und α -Ketoglutarat dem Energiestoffwechsel zugeführt werden. Die Konzentrationsänderungen der drei Aminosäuren von einem Tag der Entwicklung zum nächsten sind in Abb. 4.4 dargestellt.

Der Zeitpunkt der größten Konzentrationsabnahme fällt mit dem Zeitpunkt erhöhten Stoffwechsels zusammen [L61][L62]: bei Prolin zu Beginn, bei Arginin und Histidin auch am Ende der Entwicklung. Möglicherweise werden diese Aminosäuren zum Aufbau neuer Enzyme und Strukturproteine verwandt. Prolin ist beispielsweise zu etwa 10 % im Kollagen von *Tenebrio molitor* vorhanden [L56].

Phenylalanin und Tyrosin spielen eine wichtige Rolle bei der Sklerotisierung der neuen Kutikula. Tyrosin wird aus Phenylalanin gebildet, wodurch die niedrigere Konzentration an Phenylalanin in Hämolymphe und Gewebe zu erklären ist. Über Dihydroxyphenylalanin (Dopa) wird Tyrosin zu Dopamin und N-Acetyldopamin umgebaut. Aus diesen Produkten werden in weiteren Reaktionen die sklerotisierenden Substanzen aufgebaut [L176]. Über Dopachinon oder zusammen mit Cystein über Cysteinyl-dopa entsteht Melanin, das enzymatisch nicht mehr abgebaut werden kann [L150]. Phenylalanin und Tyrosin werden bei *Zophobas* nach der Häutung zur Puppe in erheblichem Umfang metabolisiert (Abb. 4.5).

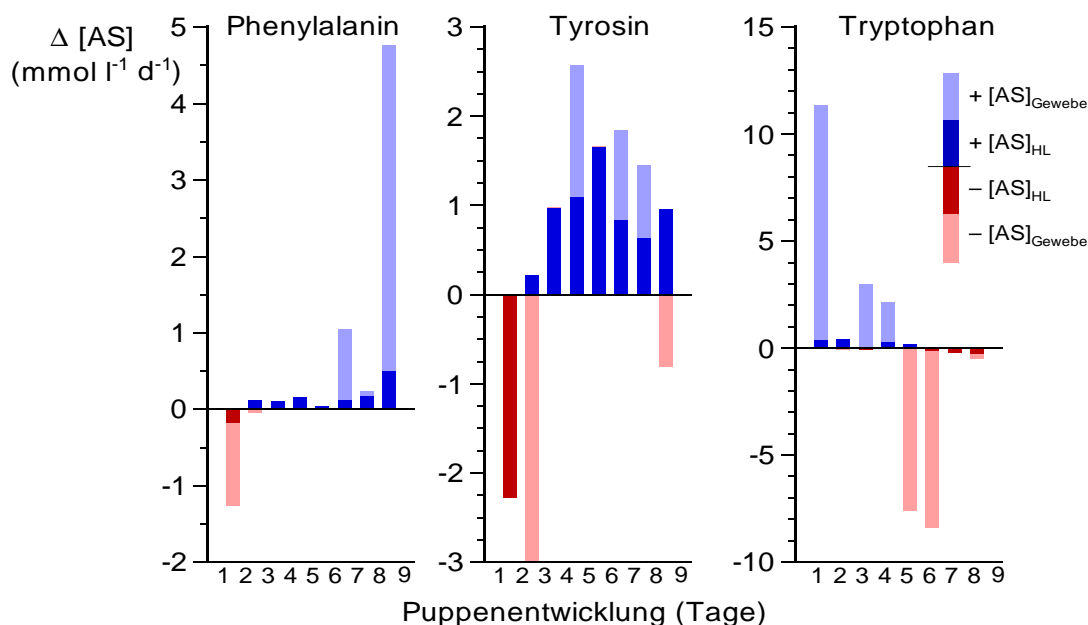


Abbildung 4.5 Konzentrationsänderungen von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan in der Hämolymphe (dunkel) und im Gewebe (blass) während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die Änderungen wurden von einem Tag der Puppenentwicklung auf den nächsten berechnet. Zunahmen der Konzentration sind in positiver, Abnahmen in negativer Richtung an der Ordinate aufgetragen. Die Ordinaten sind unterschiedlich skaliert. Phenylalanin und Tyrosin werden zur Sklerotisierung der Kutikula, Tryptophan zum Aufbau von Ommochromen verwandt.

Auch bei den Raupen des Seidenspinners *Bombyx mori* sinkt die Tyrosinkonzentration nach jeder Häutung [L45]. Im Laufe der Puppenentwicklung steigen die Konzentrationen von Phenylalanin und Tyrosin wie bei *Bombyx mori* wieder an. Offensichtlich wird nach der Sklerotisierung der Puppenkutikula neues Substrat für die Sklerotisierung nach der Imaginalhäutung aus Arylphorinen bereitgestellt [L154].

Tryptophan wird im Gegensatz dazu zunächst vor allem im Gewebe angereichert und in der zweiten Hälfte des Puppenstadiums entfernt (siehe Abb. 4.5). Die Insekten sind nicht in der Lage, Tryptophan als Energiesubstrat zu nutzen [L176]. Die aromatische Aminosäure wird vielmehr zur Bildung von braun oder rot gefärbten Ommochromen verwandt, die vor allem in die Augen oder in die Epidermis eingelagert werden [L176]. Dies zeigt sich bei *Zophobas* an der Braunfärbung der Augen und Tarsenspitzen ab dem 6. Tag der Puppenentwicklung.

Aus den gemessenen und berechneten Ergebnissen kann ein Modell der Stoffwechselwege für die untersuchten Aminosäuren zu Beginn (Abb. 4.6) und zum Ende (Abb. 4.7) des Puppenstadiums erstellt werden.

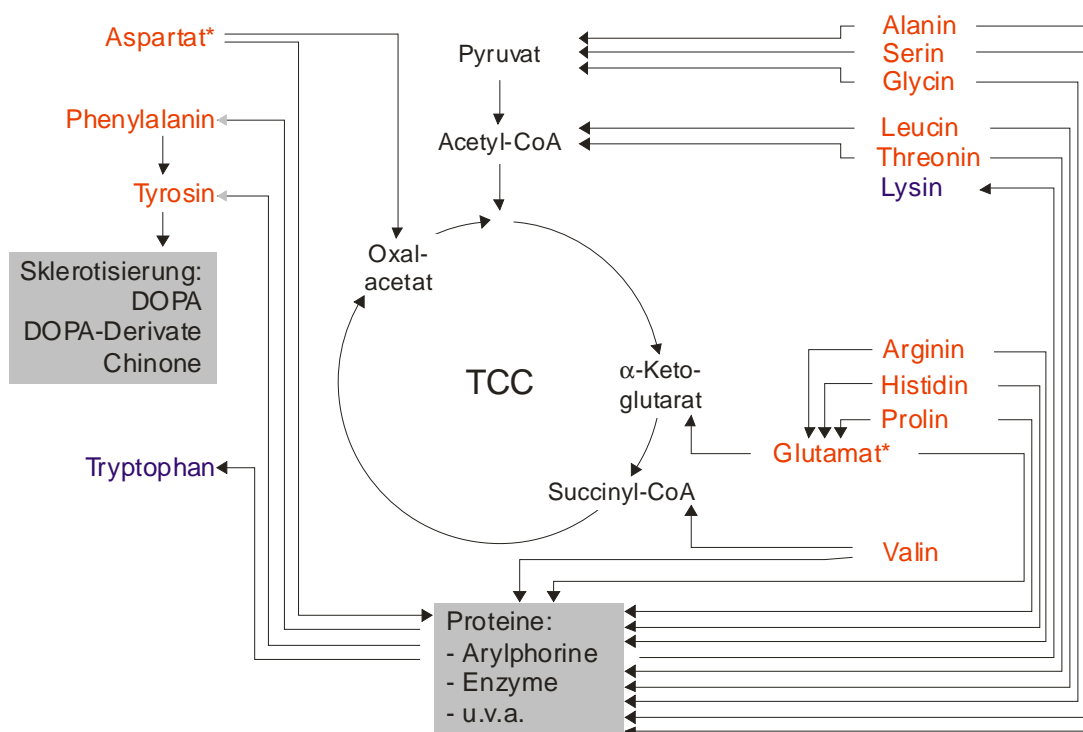


Abbildung 4.6 Hypothetischer Metabolismus von Aminosäuren bei *Zophobas rugipes* zu Beginn des Puppenstadiums. Der Trikarbonsäurezyklus (TCC) wird durch anaplerotische Reaktionen von Aminosäuren aufgefüllt. Aminosäuren mit abnehmender Konzentration sind rot, mit zunehmender Konzentration blau dargestellt. Aspartat und Glutamat (*) wurden nur in Spuren nachgewiesen. Zu Beginn des Puppenstadiums wird die neu gebildete Kutikula sklerotisiert.

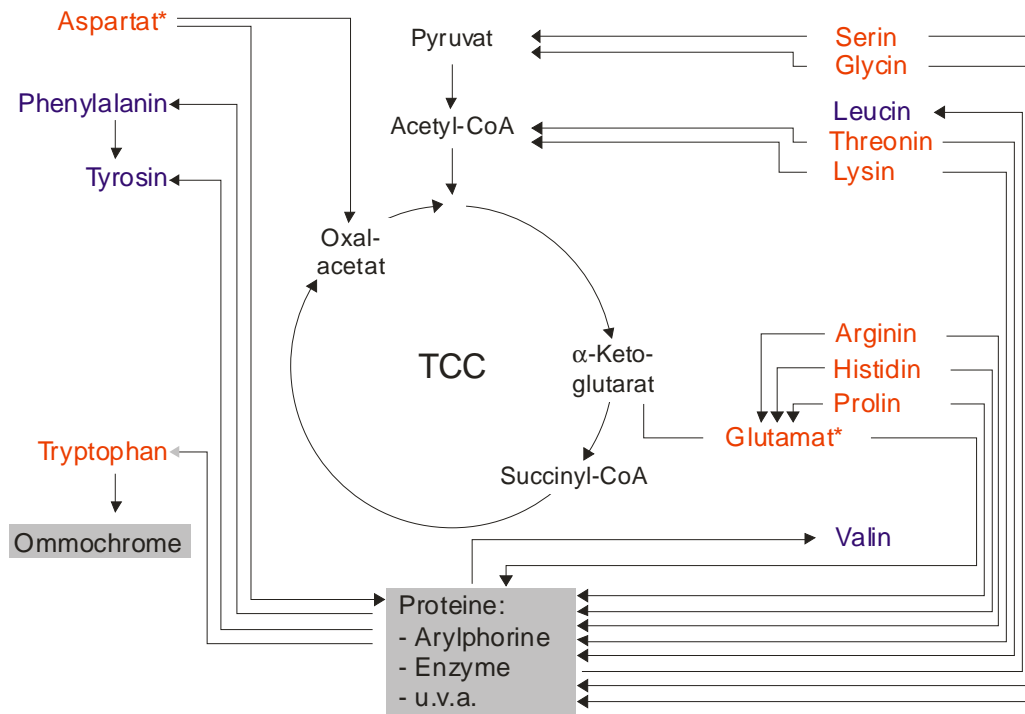


Abbildung 4.7 Hypothetischer Metabolismus von Aminosäuren bei *Zophobas rugipes* zum Ende des Puppenstadiums. Der Trikarbonsäurezyklus (TCC) wird durch anaplerotische Reaktionen von Aminosäuren aufgefüllt. Aminosäuren mit abnehmender Konzentration sind rot, mit zunehmender Konzentration blau dargestellt. Aspartat und Glutamat (*) wurden nur in Spuren nachgewiesen. Zum Ende des Puppenstadiums färben sich die Augen und Tarsen durch neu gebildete Ommochrome.

Der Stoffwechsel der Aminosäuren ist komplex, dennoch können aus den Messungen der Konzentrationen während der Entwicklung Rückschlüsse auf Prozesse im Puppenorganismus gezogen werden. Vor allem zu Beginn und zum Ende der Entwicklung finden vielfältige Abbau- und Aufbauvorgänge statt, die eine starke Veränderung des Aminosäuremusters verursachen. In der Mitte des Puppenstadiums, wenn der Stoffwechsel ein Minimum erreicht, werden die Konzentrationen vieler Aminosäuren durch Proteinabbau wieder erhöht. Dieser Prozess dient zur Vorbereitung auf die Imaginalhäutung und den während und nach dieser Phase auftretenden anabolischen und katabolischen Reaktionen. Die kontinuierliche Abnahme der Prolinkonzentration spricht für die Verwendung der Aminosäure als Energielieferant oder als Substrat für den anaplerotischen Stoffwechsel des Citratzyklus.

4.4 Ionenbilanz

Das Gebot der Elektroneutralität erfordert, dass sich positive und negative Ladungen in Kompartimenten lebender Organismen ausgleichen. Die Bilanz der untersuchten anorganischen Ionen in der Hämolymphe von *Zophobas* zeigt während des gesamten Puppenstadiums einen Überschuss positiver Ladungen. Die Anionenlücke, die in früheren Arbeiten als starke Ionen-differenz („strong ion difference SID“) bezeichnet wird, wird vor allem durch negativ geladene, organische Ionen geschlossen.

Die von einigen Autoren aufgestellte Vermutung, die freien Aminosäuren könnten einen großen Teil der organischen Anionen stellen, bestätigte sich in dieser Arbeit nicht [L99]. Vielmehr trug die Gesamtladung der Aminosäuren zur Vergrößerung der Lücke bei.

Ein Teil der anorganischen Kationen ist an Makromoleküle gebunden: CARRINGTON & TENNEY fanden nach Ultrafiltration der Hämolymphe von *Telea polyphemus* nur noch 60 meq l^{-1} statt 75 meq l^{-1} Magnesium und 8 meq l^{-1} statt 10 meq l^{-1} Calcium, eine Verringerung um jeweils 20 %. Die Konzentration von Kalium blieb dagegen unbeeinflusst [L26]. Bei der Mehlmotte *Galleria mellonella* wurden 9 % gebundenes Natrium und 2 % gebundenes Kalium gefunden [L140]. In der Hämolymphe der Küchenschabe *Periplaneta americana* wurden durch Ultrafiltration 22 % Natrium, 25 % Magnesium, 16 % Calcium, aber auch 10 % Chlorid zurückgehalten [L183]. KLOTZ wies nach, dass die Anzahl der gebundenen Ionen von ihrer Konzentration abhängig ist. Auch Chlorid wird gebunden. Proteine sind zwar insgesamt negativ geladen, können aber an positiv geladenen Gruppen Anionen binden. An ein Molekül Serumalbumin binden beispielsweise zehn Chloridionen [L101]. Auch bei den Puppen von *Zophobas* wird ein Teil der Ionen an Moleküle wie Proteine gebunden sein. Ein Hinweis darauf könnte die positive Korrelation zwischen den Konzentrationen von Magnesium und Chlorid und der Proteinkonzentration je Altersabschnitt sein (Abb. 4.8).

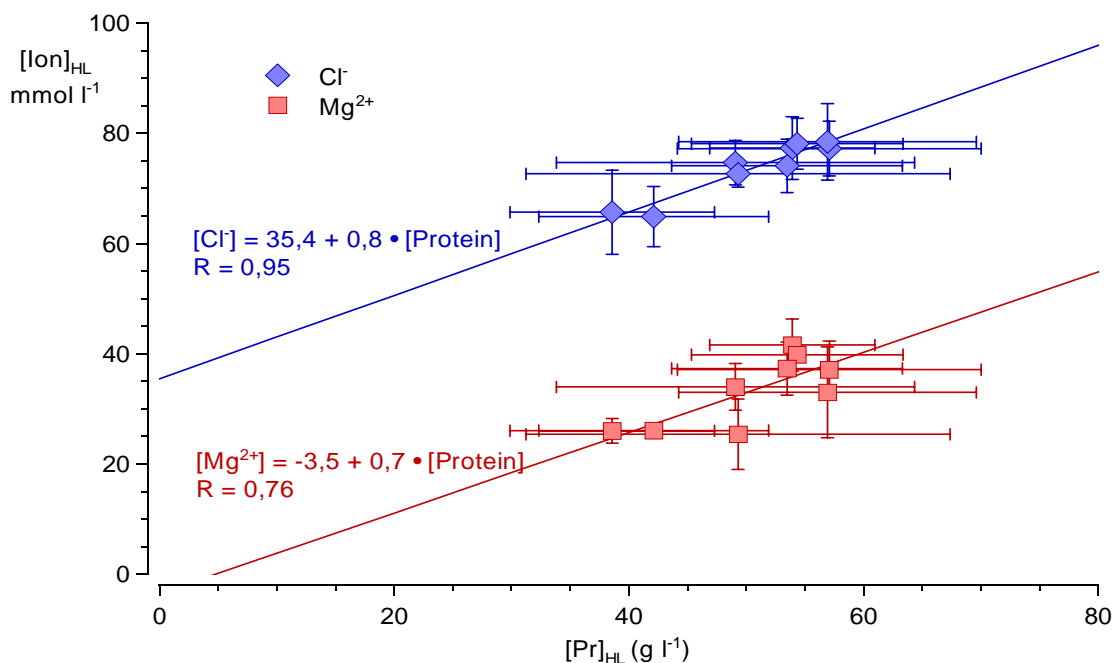


Abbildung 4.8 Korrelation zwischen Chlorid-, Magnesium- und Proteinkonzentration in der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die Korrelation deutet auf ein gemeinsames Auftreten der Ionen mit Proteinen und damit möglicherweise auf eine Bindung von Chlorid oder Magnesium an Proteine hin. Für Kalium und Calcium ergab sich keine Korrelation.

Nimmt man an, dass jeweils etwa 10 % Natrium, 15 % Magnesium, 20 % Calcium und etwa 10 % Chlorid in der Hämolymphe gebunden sind, dann verbessert sich die Bilanz zwar etwas, ist aber noch immer nicht ausgeglichen.

Durch Kohlendioxidäquilibrierung und mithilfe der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung wurde in Kapitel 3.17 auf Seite 38 die Bikarbonatkonzentration der Hämolymphe bestimmt. Die

Berechnung zeigt, dass etwa 10 mmol l^{-1} Bikarbonat einen Beitrag zum Ladungsausgleich in der Hämolymphe leisten.

Weitere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Anionen, die in der Hämolymphe von Insekten gefunden wurden, sind organische Säuren aus dem Zuckerstoffwechsel, Sulfate und Phosphate.

Die Stoffwechselprodukte Citrat, Succinat und Malat wurden in der Hämolymphe von *Manduca sexta* in Konzentrationen von je 7 meq l^{-1} , $1,6 \text{ meq l}^{-1}$ und $0,8 \text{ meq l}^{-1}$ gefunden [L132]. KIEßLING wies bei diversen Schmetterlingen in allen Stadien Citrat, Fumarat, Malat und Succinat nach. Citrat wurde dabei teilweise in hohen Konzentrationen bis $23,7 \text{ meq l}^{-1}$ gefunden. Auch Malat erreichte Konzentrationen bis $10,5 \text{ meq l}^{-1}$ bei diapausierenden Puppen des Totenkopfschwärmers *Acherontia atropos* [L99]. Bei *Zophobas* wurden diese organischen Säuren nur im Homogenat untersucht und nur in geringen Konzentrationen quantifiziert [L61].

Sulfate treten bei Insekten in der Hämolymphe in geringen Konzentrationen auf: z.B. bei *Manduca sexta* in der Hämolymphe zu $1,2 \text{ meq l}^{-1}$ [L132]. Chondroitinsulfat ist Bestandteil des Bindegewebes und bindet monovalente Kationen wie Natrium und Kalium [L51]. Bindegewebe findet sich bei Insekten vor allem an der Muskeleoberfläche und wird dort von Hämolymphe umgeben. Eine Maskierung von Kationen der Hämolymphe ist demnach möglich [L139].

Anorganische Phosphate unterliegen entwicklungsbedingten Schwankungen: DUVAL & PORTIER fanden 1928 bei dem Gelbrandkäfer *Dytiscus marginalis* $3,5 \text{ meq l}^{-1}$, bei *Attacus pernyi* 4 meq l^{-1} und bei Puppen von *Cossus* etwa $3,8 \text{ meq l}^{-1}$ [L47]. Die Puppe des Wolfsmilchschwärmers *Deilephila* zeigte während der Entwicklung einen veränderlichen Phosphatgehalt in der Hämolymphe: zu Beginn noch niedrig mit $1,4 \text{ meq l}^{-1}$ stieg er nach der Histolyse auf $6,4 \text{ meq l}^{-1}$ an. Vor dem Schlüpfen fiel die Konzentration wieder auf $1,1 \text{ meq l}^{-1}$ ab [L80]. WYATT hat bei den Puppen von *Hyalophora cecropia* mit $32 - 44 \text{ meq l}^{-1}$ eine hohe Konzentration von säurelöslichen Phosphaten festgestellt [L190]. Zu dieser Gruppe gehören anorganische Phosphate, phosphorylierte Produkte des Zuckerstoffwechsels, wie Glucose-6-Phosphat oder Fructose-6-Phosphat und Phosphagene, wie Kreatinphosphat oder Argininphosphat [L100]. Die Konzentration der anorganischen Phosphate, die zu Beginn des Puppenstadiums noch bei $7 - 13 \text{ meq l}^{-1}$ lag, sank bei der Adultinitiation auf $4-5 \text{ meq l}^{-1}$ [L190]. Aus der Differenz zwischen säurelöslichen und anorganischen Phosphaten ergibt sich eine Konzentration von etwa 30 meq l^{-1} organisch gebundener Phosphate. WYATT fand vor allem α -Glycerolphosphat, N-Acetyl-Galactosamin, Uridindiphosphat und ein nicht näher bezeichnetes Phosphagen, aber nur Spuren von ATP [L190]. Als Phosphagen ist bei Insekten bisher nur Argininphosphat entdeckt worden [L176].

Die in der Literatur gefundenen Werte wurden für eine neue, theoretische Ionenbilanz verwandt (Abb. 4.9). Die Berechnung der Ladungsanteile dieser Anionen erfolgte mit Hilfe von Gleichung 5 auf Seite 15 (pH-Wert: 7,0; pK-Werte aus [L85][L181]). Der für die Ionenbilanz entscheidende Anteil negativer Ladung ergab sich aus dem Produkt der Ladungsfractionen und den oben genannten Literaturwerten.

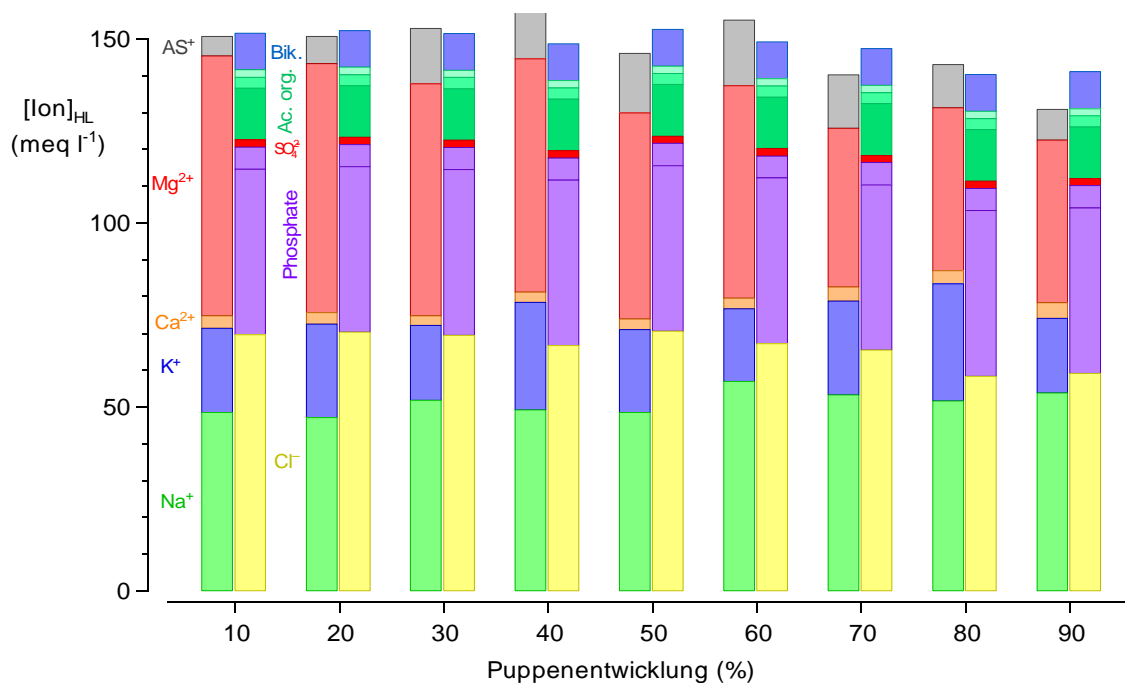


Abbildung 4.9 Theoretische Ionenbilanz in der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Ein Teil der gemessenen Ionen wurde um einen gebundenen Anteil korrigiert (Na^+ und Cl^- um 10 %, Mg^{2+} um 15 %, Ca^{2+} um 20 %). Die Bikarbonatkonzentration wurde in den *in vitro* Versuchen bestimmt (s. Kapitel 3.17 auf Seite 38). Für organische und anorganische Phosphate, Sulfate und organische Säuren wurden Konzentrationsangaben aus der Literatur entnommen und der Anteil negativer Ladung berechnet (nähere Angaben im Text). Es ergibt sich eine ausgeglichene Bilanz (Ac.Org.: organische Säuren, AS: Aminosäuren).

Die gemessenen Ionenkonzentrationen wurden um den Anteil der gebundenen Ionen reduziert (siehe Abb. 4.9 auf Seite 69). Anionen wurden um Bikarbonat, Phosphate, Sulfate und organische Säuren ergänzt. Dabei sind die pK-Werte der funktionellen Gruppen für ihre Gesamtladung entscheidend (Gleichung 5 auf Seite 15). Phosphate, die einen pK-Wert im Bereich von 7 besitzen, liegen in physiologischen Lösungen etwa zur Hälfte als einfach geladenes Dihydrogenphosphat und als doppelt geladenes Monohydrogenphosphat vor. Die in der Literatur gefundenen 4 meq l^{-1} anorganisches Phosphat [L47] tragen demnach etwa 6 meq l^{-1} negative Ladungen. Sulfate und organische Säuren liegen aufgrund ihres niedrigen pK-Werts in physiologischen Lösungen vollständig deprotoniert vor und tragen zwei oder im Falle von Citrat drei negative Ladungen. Die Ionenbilanz wird durch die ergänzten Anionen vollständig ausgeglichen. Sie bedarf aber einer experimentellen Überprüfung.

4.5 Osmolarität

Die Bestimmung der Osmolarität mit dem Dampfdruckosmometer ist eine häufig verwandte Methode. Vorteile ergeben sich durch genaue Reproduzierbarkeit und geringe Probenvolumina. Die wichtigsten Voraussetzungen für exakte Messungen sind genaue Kalibrierung und ein peinlich sauberer Thermistor als Sensor. Aus diesem Grund wurde das Gerät wiederholt gereinigt. Da es nicht immer möglich war, das erforderliche Probenvolumen von exakt $8 \mu\text{l}$ in den Kapillaren aufzunehmen, wurde untersucht, wie sich schwankende Probenvolumina auf die Ergeb-

nisse auswirken. Dazu wurde die Osmolarität verschiedener Volumina eines Standards mit $290 \text{ mosmol l}^{-1}$ gemessen und gegen das Volumen aufgetragen (Abb. 4.10).

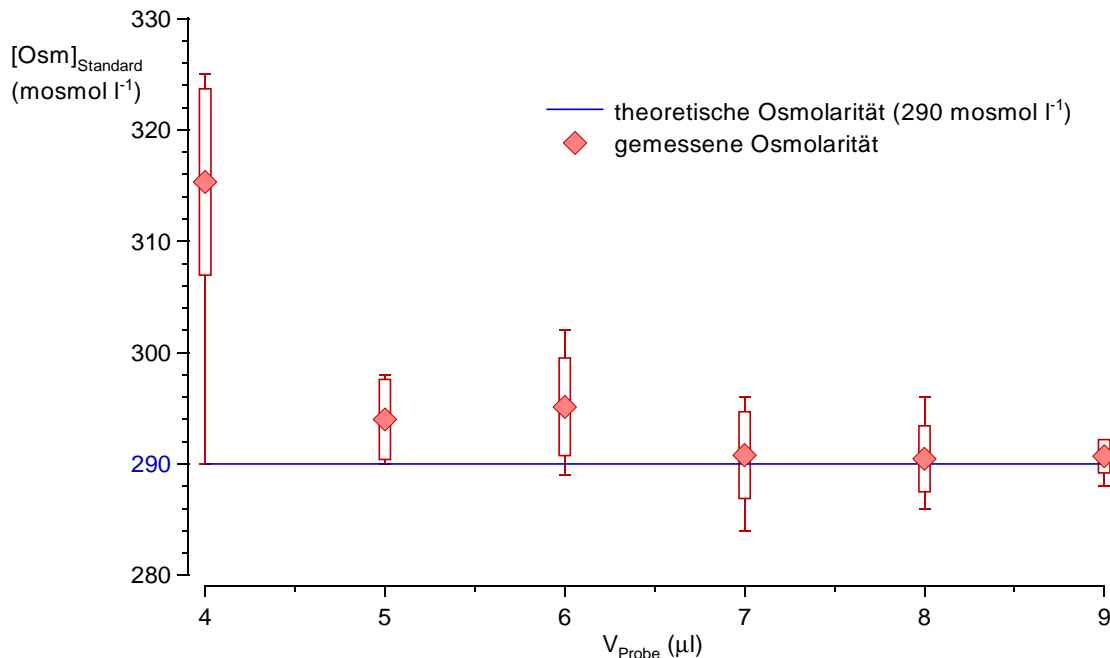


Abbildung 4.10 Unterschiede zwischen theoretischer und gemessener Osmolarität eines Standards in Abhängigkeit vom Probenvolumen. Dargestellt sind Mittelwerte von 5 Messungen mit Standardabweichung (Balken), sowie die maximal und minimal gemessene Osmolarität. Geringfügige Abweichungen vom erforderlichen Volumen von $8 \mu\text{l}$ wirken sich nicht auf die durchschnittlichen Ergebnisse aus. Die Variabilität sinkt mit zunehmendem Probenvolumen.

Das Diagramm zeigt, dass die gemessene Osmolarität im Bereich von 7 bis $9 \mu\text{l}$ nicht vom verwandten Probenvolumen abhängt, aber die Streuung mit größerem Volumen abnimmt.

Terrestrische Insekten können die Osmolarität der Hämolymphe im Bereich von 100 bis $450 \text{ mosmol l}^{-1}$ regulieren [L36]. Untersuchungen zeigen, dass Aminosäuren in der Hämolymphe zur Osmoregulation verwandt werden. Stechmückenlarven (*Culicidae*) regulieren die intra- und extrazelluläre Osmolarität durch Änderung der Prolinkonzentration, wenn sie von Süßwasser in Salzwasser überführt werden [L133]. Die Regulation der Osmolarität mit organischen Substanzen ist im Tierreich sonst nur noch bei den marinen Elasmobranchiern bekannt, die bei Ionenregulation Isoosmolarität durch Anreicherung von Harnstoff erreichen.

Darüber hinaus können Insekten extrem hohe Konzentrationen an gelösten Substanzen im Organismus tolerieren. Bei der neuseeländischen Zikade *Hemideina maori* schwanken die Osmolaritäten zwischen $400 \text{ mosmol l}^{-1}$ im Sommer und $700 \text{ mosmol l}^{-1}$ im Winter [L147]. GEHRKEN & SØMME zeigten, dass dehydrierte Käfer Osmolaritäten bis $1000 \text{ mosmol l}^{-1}$ ertragen [L58]. Dabei stellten die Autoren fest, dass Chrysomeliden Osmoregulierer sind, Tenebrioniden aber nicht.

Die Osmolarität der Puppenhämolymphe von *Zophobas* lag im Bereich zwischen 350 und $372 \text{ mosmol l}^{-1}$. Die Osmolarität zeigte dabei keine Abhängigkeit vom Hämolympfvolumen. Die untersuchten Substanzen decken nur zwischen 61 und 73% der Osmolarität. Mit der theoretischen Ionenbilanz aus Abb. 4.9 auf Seite 69 können bereits ca. 90% der Osmolarität definiert werden. Die restlichen 10% setzen sich aus Makromolekülen, z.B. Proteinen und den von

ihnen komplexierten Ionen, sowie aus ungeladenen Substanzen zusammen. Der Anteil der Proteine an der Osmolarität läßt sich dabei schwer abschätzen. Da sie mehrere Zentren zur Ionenbindung besitzen, kann man die Anzahl der gebundenen Ionen nicht mit der Anzahl der bindenden Proteine gleichsetzen. Zudem besitzen Proteine unterschiedliche molare Massen, so daß aus der gemessenen Konzentration in g l^{-1} sich nicht direkt die molare Konzentration ergibt. Die molare Masse der Proteine in der Hämolymphe von Insekten liegt zwischen 15 kDa bei Lysozymen von *Hyalophora cecropia* und 500 kDa bei Speicherproteinen von *Bombyx mori* (Zusammenfassung siehe [L192]). Die mittlere molare Masse beträgt etwa 50 kDa. Dadurch kann der Anteil der Proteine an der Osmolarität näherungsweise berechnet werden. Bei einer Proteinkonzentration von 50 g l^{-1} beträgt die molare Konzentration der Proteine nicht mehr als 1 mmol l^{-1} . Das sind etwa 0,3 % der gesamten Osmolarität.

Im Jahre 1957 identifizierten WYATT & KALF das Disaccharid Trehalose als Blutzuckermolekül der Insekten [L189]. Seit dieser Zeit wurde Trehalose in vielen Insekten zum Teil in großen Mengen gefunden. PATRICK & BRADLEY wiesen nach, dass die Larven der Mücke *Culex tarsalis* das Molekül für die Osmoregulation verwenden [L134]. Auch bei adulten *Zophobas rugipes* wurde der Zucker in einer Konzentration von etwa 26 mmol l^{-1} gefunden, daneben wurde Glucose in einer Konzentration von 17 mmol l^{-1} nachgewiesen [L57].

Mit diesen aus der Literatur gewonnenen Daten läßt sich eine neue Osmolaritätsbilanz erstellen (Abb. 4.11). Sie zeigt, dass die Osmolarität durch die untersuchten oder aus Literaturquellen übernommenen Bestandteile zu 82 - 100 % definiert werden kann. Die restlichen nicht identifizierten Bestandteile können Metabolite von Stoffwechselwegen, wie Sklerotisierung und Melanisierung, oder Abbauprodukte wie Harnsäure oder Harnstoff sein [L80][L176].

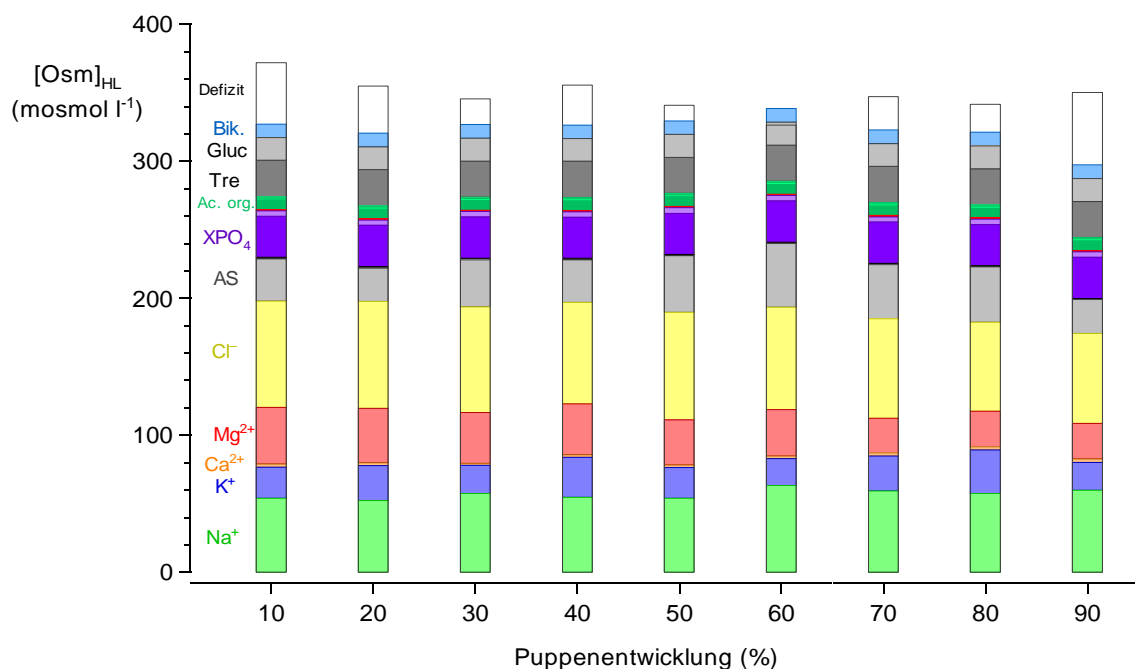


Abbildung 4.11 Osmolarität in der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Die Säulen basieren auf Daten dieser Arbeit und auf Daten aus der Literatur. Nur ein geringer Teil der Bestandteile, die zur Osmolarität beitragen, konnte nicht identifiziert werden. AS: Aminosäuren, XPO_4^- : organisches und anorganisches Phosphat, Ac. org.: Organische Säuren, Tre: Trehalose, Gluc: Glucose, Bik: Bikarbonat.

4.6 Kohlendioxidgehalt von Hämolymphe, Homogenat und Gewebe

Die photometrische Bestimmung des Kohlendioxidgehalts im URAS nach Säureextraktion erfolgte mit hoher Richtigkeit und Präzision. Bei automatischer Detektion und Integration des Kohlendioxidsignals mit der Auswertungssoftware Turbolab ergaben sich Standardabweichungen unter 0,5 % bei wässrigen Standards und unter 1 % bei den Proben. Durch Kalibrierung des Systems mit verschiedenen Volumina und Konzentrationen des Bikarbonatstandards konnte ein linearer Messbereich zwischen 2,5 und 200 nmol CO₂ demonstriert werden. Die Extraktion und Erfassung von CO₂ erfolgte quantitativ.

Um verändernde Prozesse zu vermeiden, wurden die Proben schnell verarbeitet und, wenn nötig, bei -20 °C gelagert. Für die Koagulation der Hämolymphe sind Hämozyten und Sauerstoff erforderlich [L68]. Durch schnelles Abzentrifugieren der Hämozyten aus der Hämolymphe wurde eine Koagulation unterbunden. Die Äquilibration erfolgte unter Sauerstoffausschluss. HARRISON stellte fest, dass Hämolymphe in Anoxie eine Abnahme des pH-Werts von etwa 0,06 pH h⁻¹ zeigte und setzte den Proben aus diesem Grund NaF zu. Ein Einfrieren der Proben hatte keine Auswirkung [L68]. Dagegen fanden BOCHE & BUCK 1942 keine Änderungen des pH-Werts in der Hämolymphe von *Chironomus tentans* über 80 Minuten, wenn sie unter einer 5 mm dicken Paraffinschicht aufbewahrt wurde. Der pH-Wert stieg sogar, wenn die Hämolymphe Luft ausgesetzt wurde. Dies erklärten die Autoren mit entweichendem CO₂ [L14].

Die Löslichkeit von CO₂ in Proben wird durch ihre Zusammensetzung stark beeinflusst [L76]. Auf die Zugabe von Additiven, wie NaF oder Entschäumer [L18] wurde aus diesem Grund verzichtet. Die Verdünnung der Homogenate und der Hämolymphe wurde ausschließlich mit steril filtriertem, destilliertem Wasser durchgeführt und nicht, wie in anderen Arbeiten, mit physiologischen Salzlösungen [L18], was den Vorteil mit sich brachte, die aus der Literatur bekannten Werte des Kapazitätskoeffizienten für CO₂ in destilliertem Wasser verwenden zu können [L39].

Das in Lösungen enthaltene Kohlendioxid setzt sich zusammen aus dem physikalisch gelösten und dem chemisch gebundenen CO₂. Die physikalische Löslichkeit wird ausgedrückt durch den physikalischen Löslichkeitskoeffizienten α . Die mit der Gleichung nach HEISLER für *Zophobas* berechneten Werte (siehe Tabelle 3.6 auf Seite 35) unterscheiden sich von gemessenen Werten aus anderen Arbeiten: α beträgt in der Hämolymphe der Heuschrecke *Melanoplus bivittatus* 0,0512 mmol l⁻¹ Torr⁻¹ (0,384 mmol l⁻¹ kPa⁻¹) bei 15 °C [L68]. α in der Hämolymphe von *Zophobas rugipes* ist mit 0,056 mmol l⁻¹ Torr⁻¹ (0,422 mmol l⁻¹ kPa⁻¹) größer. Im Homogenat von *Hyalophora cecropia* wurden bei 20 °C 0,053 mmol l⁻¹ Torr⁻¹ (0,398 mmol l⁻¹ kPa⁻¹) gemessen [L18]. Der Löslichkeitskoeffizient im Homogenat von *Zophobas* ist mit 0,055 mmol l⁻¹ Torr⁻¹ (0,410 mmol l⁻¹ kPa⁻¹) geringfügig höher.

In Abb. 4.12 sind die Sättigungsfunktionen von Hämolymphe, Gewebe und Homogenat der Puppen von *Zophobas* einigen Werten aus der Literatur gegenübergestellt. Die Hämolymphe besitzt eine CO₂-Sättigungskurve, die in ihrer Steilheit und Höhe der von Spinnenhämolymphe entspricht (Ec: *Eurypelma californicum*, Cs: *Cupiennius salei* aus PAUL *et al.* [L136]). Die Sättigungsfunktion des Homogenats ähnelt stark denen der Hämolymphe von *Gastrophilus intestinalis* (Gi, LEVENBOOK [L112]) und *Melanoplus bivittatus* (Mb, HARRISON [L68]). Die

berechnete Sättigungsfunktion des Gewebes von *Zophobas rugipes* ist zu vergleichen mit der Sättigungsfunktion des Hundemuskel [L93] und der Hämolymphe der Honigbiene *Apis mellifera* bei 25 °C (Am, BISHOP [L13]). Die von BRIDGES & SCHEID für das Gewebe des Schwärmers *Hyalophora cecropia* gemessene Bindungskurve bei 20 °C liegt dagegen deutlich niedriger [L18]. Die geringe CO₂-Bindungsfähigkeit der Hämolymphe von Schmetterlingspuppen scheint ein allgemeines Charakteristikum zu sein, wie die Ergebnisse von BUCK & FRIEDMAN an der Hämolymphe von *Agapema galbina* und *Hyalophora cecropia* (Ag, Hc [L22]) und die Ergebnisse von KIEßLING an der Hämolymphe von *Acherontia atropos* und *Attacus atlas* (Axa, Aa [L99]) zeigen.

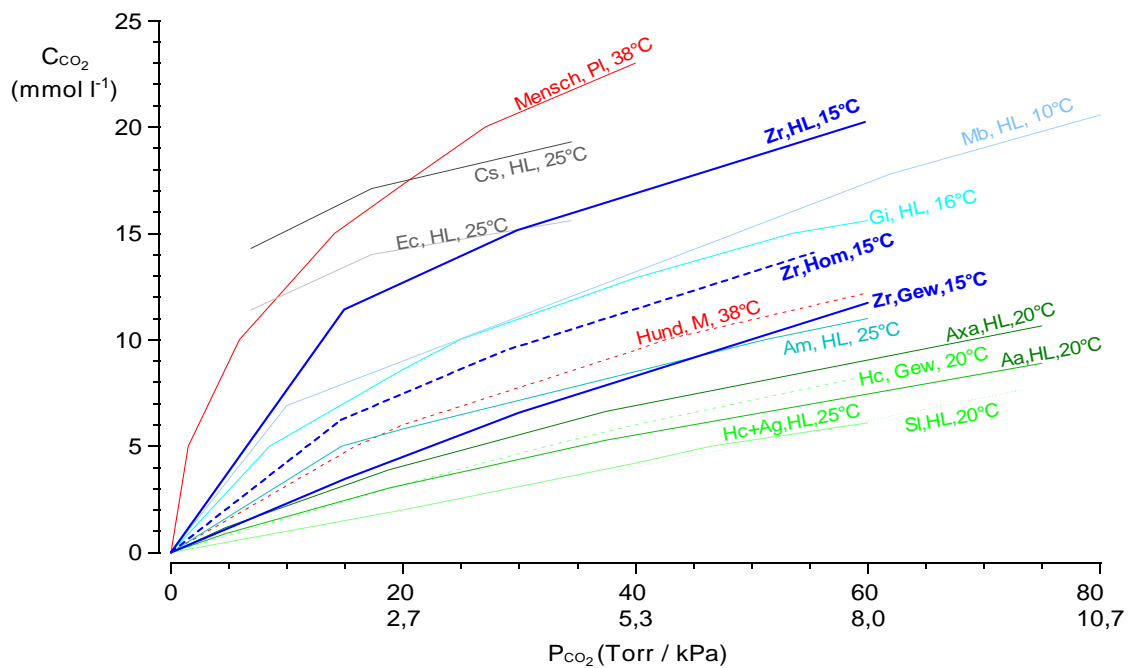


Abbildung 4.12 Kohlendioxidbindungskurven von Plasma, Hämolymphe (HL), Homogenat (Hom), Gewebe (Gew) und Muskel (M) verschiedener Tiere. Am: *Apis mellifera*, BISHOP, 1923 [L13]; Hc: *Hyalophora cecropia*, BRIDGES & SCHEID, 1982 [L18]; Hc + Ag: *Hyalophora galbina*, *Agapema galbina*, BUCK & FRIEDMAN, 1958 [L22]; Mensch: CHRISTIANSEN *et al.*, 1914 [L33] zitiert in [L18]; Mb: *Melanoplus bivittatus*, HARRISON, 1988 [L68]; Hund: IRVING *et al.*, 1932 [L93]; Aa: *Attacus atlas*, Axa: *Acherontia atropos*, KIEßLING, 1997 [L99]; Gi: *Gastrophilus intestinalis*, LEVENBOOK, 1950 [L112]; Cs: *Cupiennius salei*, Ec: *Eurypelma californicum*, PAUL *et al.*, 1994 [L136]; Sl: *Sphinx ligustri*, PUNT *et al.*, 1957 [L145]; Zr: *Zophobas rugipes*, diese Arbeit.

Die Kohlendioxidsättigungsfunktionen von Hämolymphe, Homogenat und Gewebe der Puppen von *Zophobas* ähneln in ihrer Form denen anderer zoologischer Flüssigkeitskompartimente. Sie zeigen alle einen hyperbolischen Verlauf. Dieser Verlauf kann durch eine Umformung der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung erklärt werden. Die Bikarbonatkonzentration wird dabei durch die Differenz von Gesamt-CO₂ und physikalisch gelöstem CO₂ ersetzt:

$$pH = pK + \log \left(\frac{[CO_2]_{tot} - (\alpha \cdot P_{CO_2})}{\alpha \cdot P_{CO_2}} \right) \quad (\text{Gleichung 14})$$

Die Gleichung kann nach Gesamt-CO₂ aufgelöst werden:

$$[CO_2]_{tot} = \alpha \cdot P_{CO_2} \cdot \left(\frac{K + [H^+]}{[H^+]} \right) \quad (\text{Gleichung 15})$$

Der Gesamtgehalt an Kohlendioxid ist nach Gleichung 14 abhängig vom P_{CO_2} und von der Protonenkonzentration. Der physikalische Löslichkeitskoeffizient α und die Reaktionsgleichgewichtskonstante K können in erster Näherung als konstant angesehen werden. Bei Protonenkonzentrationen, die kleiner als K sind, nimmt der Quotient in Gleichung 15 Werte über 1 an und die Steigung der Funktion ist groß. Je mehr Protonen sich bei steigenden CO₂-Partialdrücken bilden, desto geringer wird der Quotient. Sind schließlich sehr hohe Protonenkonzentrationen erreicht, nähert sich der Quotient Werten von 1 an. Die Steigung der CO₂-Bindungskurve, also der Kapazitätskoeffizient β , nähert sich asymptotisch α an. Zudem lässt sich durch die Gleichung verdeutlichen, dass physiologische Lösungen mit hohem pH-Wert bei niedrigen CO₂-Partialdrücken einen größeren Kapazitätskoeffizienten aufweisen, als solche mit niedrigem pH-Wert. Eine Analyse der gemessenen pH-Werte für die in Abb. 4.12 dargestellten Versuchstiere zeigt, dass Schmetterlingspuppen, die oft niedrige pH-Werte um etwa 6,5 in der Hämolymphe besitzen, die geringsten Werte für β aufweisen [L18][L83][L99]. Heuschrecken wie *Melanoplus* und *Schistocerca* besitzen, ähnlich wie *Zophobas*, pH-Werte um 7 und einen etwas höheren Kapazitätskoeffizienten [L68][L70]. Der pH-Wert in der Hämolymphe der untersuchten Spinnen liegt zwischen 7,5 und 7,1, die CO₂-Bindungskurve steigt steil an [L136]. Das Blutplasma des Menschen hat einen pH-Wert von 7,4 und die steilste CO₂-Bindungskurve.

Die hohe Gesamtkonzentration an CO₂, die besonders in der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas* gefunden wurde, ist vor allem auf einen hohen Anteil an Bikarbonat zurückzuführen. Die Bikarbonatkonzentrationen sind höher als bei jedem bisher untersuchten Insekt. Die in den Kompartimenten vorhandenen Puffer, die durch Aufnahme von Protonen eine Verschiebung der Gleichgewichtsreaktion des Kohlendioxids hin zu Bikarbonat verursachen, sind für einen Teil der Bikarbonatkonzentration verantwortlich. Je höher die Pufferkonzentration, desto höher ist die erreichbare Bikarbonatkonzentration. Wird die Protonenkonzentration durch eine große Menge an Puffer reguliert, so steigt der Kohlendioxidgehalt über einen großen Partialdruckbereich von Kohlendioxid annähernd linear an. Dies ist in Abb. 4.12 am Beispiel des Gewebes von *Hyalophora cecropia* oder *Zophobas* zu beobachten [L18]. Die Abnahme der puffernden Wirkung wird durch eine starke Abflachung der Kohlendioxidbindungskurve erkennbar.

Die Pufferwirkung wird durch die Steigung des pH-Bikarbonat-Diagramms verdeutlicht (Abb. 3.16, Kapitel 3.17 auf Seite 38). Nach HEISLER beträgt der Pufferwert im Zellwasser von Gewebe zwischen 40 und 70 meq l⁻¹ pH⁻¹. Das extrazelluläre Interstitium hat meist nicht mehr als 1 - 4 meq l⁻¹ pH⁻¹ [L77].

Bei Puppen von *Zophobas* ist der Pufferwert des Gewebewassers mit 59,3 meq l⁻¹ pH⁻¹ etwa 3,5-fach größer als derjenige der Hämolymphe mit 17,0 meq l⁻¹ pH⁻¹. *Hyalophora cecropia* hat im Zellwasser 75 meq l⁻¹ pH⁻¹ [L18], was etwa 58 meq l⁻¹ pH⁻¹ im Gewebewasser entspricht [L76]. Ähnliche Ergebnisse sind aus Arbeiten von HEISLER & PIIPER am Muskel des Rattenzwerchfells bekannt (52,3 - 53,0 meq l⁻¹ pH⁻¹ [L78][L75]).

Die Hämolymphe von *Zophobas* besitzt wie die Hämolymphe aller bisher untersuchten Arthropoden einen deutlich geringeren Pufferwert. LEVENBOOK bestimmte bei *Gastrophilus intestinalis* einen Wert von $23 \text{ meq l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$, der sich durch Dialyse auf $17 \text{ meq l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$ verringerte [L113]. Ein ähnlicher Wert findet sich in der Hämolymphe der Heuschrecke *Taeniopoda eques* mit $16,6 \text{ meq l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$ [L78].

KIEßLING verglich den Säure-Basen-Status der Hämolymphe aller Stadien einiger Schmetterlinge und fand deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Phasen der Entwicklung [L99]. Die Puppen der untersuchten Schmetterlinge zeichneten sich durch niedrige pH-Werte und hohe Kohlendioxidpartialdrucke aus. Der Nichtbikarbonat-Pufferwert blieb jedoch, wie auch während der Puppenentwicklung von *Zophobas*, in allen Stadien gleich.

Die Pufferung erfolgt in vielen Kompartimenten hauptsächlich durch die Histidengruppen der Proteine. In einigen Arbeiten wurde der Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Pufferwert untersucht. In dieser Arbeit wurden keine Untersuchungen zu diesem Zusammenhang durchgeführt, da der Pufferwert für alle Altersstufen und Versuchstiere zusammengefasst wurde. Trotzdem lassen sich die gefundenen Ergebnisse in eine Gruppe von Literaturwerten einreihen. In Abb. 4.13 sind Pufferwerte in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration einiger untersuchter Tierarten dargestellt.

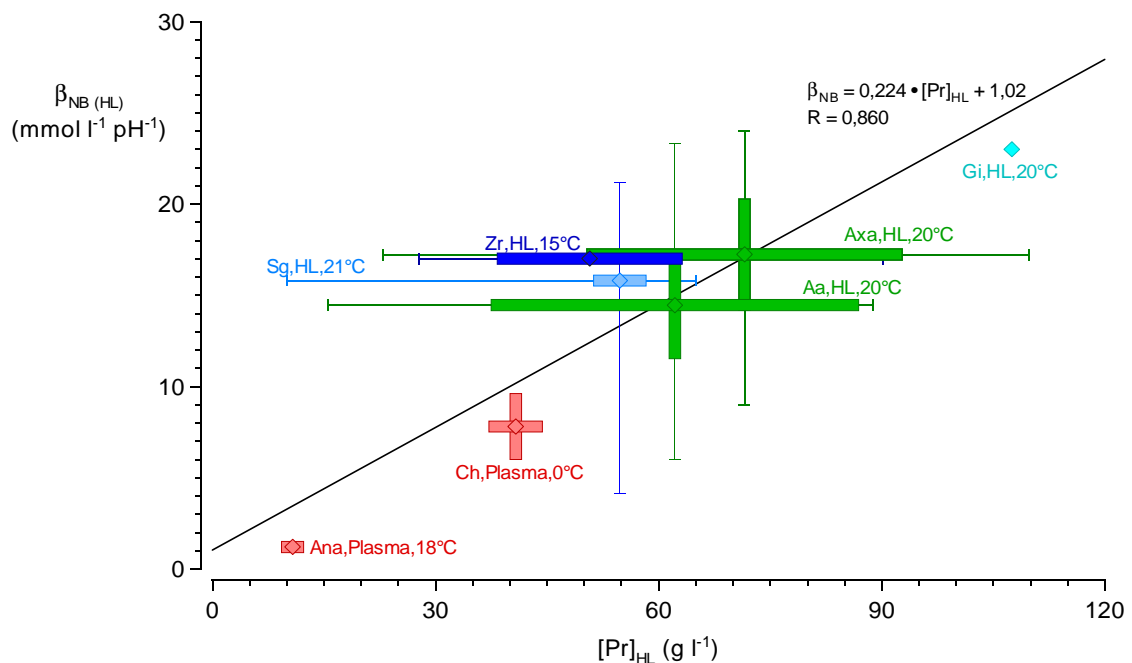


Abbildung 4.13 Proteinkonzentration und Pufferwert in Hämolymphe und Plasma verschiedener Tierarten. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung, Maxima und Minima. Ch: *Chionodraco hamatus*, Ana: *Anguilla anguilla*, ACIERNO *et al.*, 1997 [L1]; Sg: *Schistocerca gregaria*, HARRISON *et al.*, 1990 [L71]; Aa: *Attacus atlas*, Axa: *Acherontia atropos*, KIEßLING, 1997 [L99]; Gi: *Gastrophilus intestinalis*, LEVENBOOK, 1950 [L113]; Zr: *Zophobas rugipes*, diese Arbeit.

Es zeigt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen beiden Parametern. Die Werte für die Hämolymphe der Puppen von *Zophobas* liegen sehr nahe an Werten anderer Insektenarten, wie den Schmetterlingspuppen des Totenkopfschwärmers *Acherontia atropos* und des Atlasspinners *Attacus atlas* [L99] oder der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* [L71]. Proteinkonzentration und Pufferwert im Plasma des Aales *Anguilla anguilla* und im hämoglobinlosen Blut des

Arktisches *Chionodraco hamatus* liegen deutlich niedriger [L1]. Die Pufferwerte der im Pferdemen lebenden Larve der Pferdefliege *Gastrophilus intestinalis* sind die höchsten bisher in Hämolymphe gemessenen Werte [L113].

Der Pufferwert der Hämolymphe verschiedener Insektenarten steigt in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration mit etwa $0,14 - 0,19 \text{ meq pH}^{-1} \text{ g}^{-1}$ an [L71][L99]. Aus der Regressionsfunktion in Abb. 4.13 errechnet sich der Pufferwert der Proteine in der Hämolymphe von *Zophobas* je nach Entwicklungszustand und Proteinkonzentration zu $9,7 - 13,8 \text{ meq l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$. Dies entspricht etwa 73 % des gesamten Pufferwerts. Einen Teil der restlichen Pufferung übernehmen die freien Aminosäuren. Der Pufferwert der freien Aminosäuren hängt vom pH-Wert und dem Puppenalter ab (Abb. 4.14). Je niedriger der pH, desto größer wird der Pufferwert. Bei einem pH-Wert von 7,0 nimmt er Werte zwischen $1,2 \text{ meq l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$ am 8. Tag der Entwicklung und $2,4 \text{ meq l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$ am 4. Tag der Entwicklung an. Dies sind etwa 7 - 14 % des Gesamtpufferwerts. Die fehlenden 13 - 20 % des Gesamtpufferwerts werden durch nicht näher untersuchte organische und anorganische Phosphate und organische Säuren wie Succinat gedeckt.

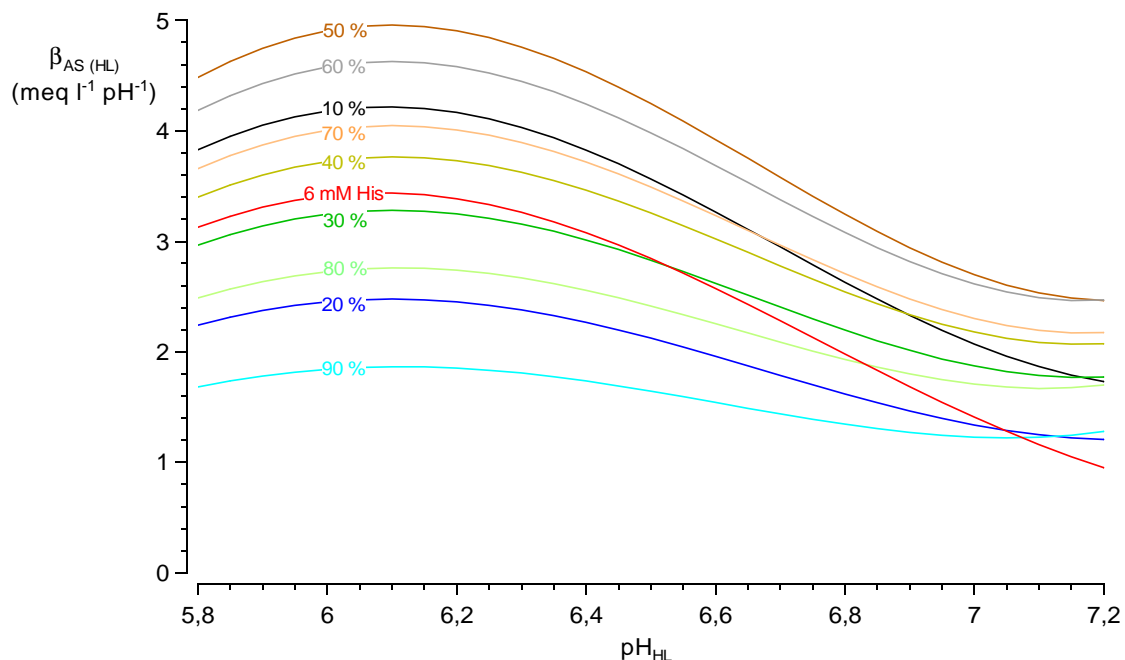


Abbildung 4.14 Pufferwert der freien Aminosäuren in der Hämolymphe während der Puppenentwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Der Pufferwert ändert sich abhängig von Entwicklungszustand und pH-Wert. Die Aminosäure Histidin trägt hauptsächlich zur Pufferwirkung der freien Aminosäuren bei. Die Prozentwerte geben das Alter der Puppen an bezogen auf die Gesamtentwicklungsdauer des Puppenstadiums (siehe Kapitel 2.1 auf Seite 7).

4.7 Zusammenfassung der Untersuchungen *in vitro*

Einige der untersuchten Parameter wie Magnesium- oder Aminosäurekonzentration der Hämolymphe zeigen während der Puppenentwicklung auffällige Veränderungen, die sich jedoch nicht auf die Kohlendioxidkapazität oder den Säure-Basen-Status auswirken. Die physikalisch-chemischen Parameter der Kohlendioxidspeicherung, die für die Speicherung in der Interburstperiode und für die Freisetzung in der Öffnungsperiode bedeutsam sind, bleiben während der gesamten Puppenentwicklung unverändert. Zum ersten Mal wurden der Säure-Basen-Status und beeinflussende Parameter über die gesamte Entwicklung eines Insektenstadiums verfolgt. Diese blieben weitgehend unverändert. Während der kurzen Dauer des Puppenstadiums besteht keine Notwendigkeit, grundlegende Parameter des Säure-Basen-Status zu ändern. Damit bestätigt sich die in einer vorausgegangenen Arbeit aufgestellte Hypothese, dass die Puppen von *Zophobas rugipes* während der Puppenentwicklung keine metabolische Kompensation durch Änderungen der CO₂-Kapazität oder des Pufferwerts, sondern eine respiratorische Kompensation durch gesteigerte Atemzyklusfrequenz durchführen, solange keine anderen Einflüsse auf die Puppen wirken [L61][L62].

4.8 Untersuchungen *in vivo*: Methodik

Bevor die Ergebnisse im einzelnen diskutiert werden, werden mögliche Fehlerquellen vor und während der Versuchsdurchführung aufgezeigt und erörtert.

pH-Elektroden. Die pH-Elektroden funktionieren nach dem Prinzip der Zweistabmesskette mit pH-empfindlicher Glaskalotte. Ihr Einsatz hat sich bereits in vorangegangenen Untersuchungen von HETZ [L81][L82][L83] und KAISER [L96][L97][L98] bewährt. Der Vorteil der Glaselektroden liegt in ihrer hervorragenden Langzeitstabilität [L81][L82]. Vorversuche zeigten, dass der pH-Wert innerhalb von 28 Stunden äußerst konstant blieb. Durch die erstmalige Verwendung von luftfrei abschließbaren Schäften, die gleichzeitig als Reservoir für die Elektrolyten dienen, wird die Stabilität weiter erhöht, da sowohl Verdunstung als auch der Einfluss von Luftdruckänderungen ausgeschaltet werden. Die gute Langzeitstabilität der Elektroden und die Verwendung von Präzisionspuffern [Ch21][Ch22] ermöglichen pH-Messungen über mehrere Tage mit einer Auflösung von einem Tausendstel pH.

Handhabung der Puppen und Implantation der Elektroden. Durch die präexperimentelle Kühlung und den vorsichtigen Transport konnten Reaktionen vermieden werden, wie sie von HARAK *et al.* beschrieben wurden [L67]. Die Autoren beobachteten während der Behandlung von Puppen des Mehlkäfers *Tenebrio molitor* heftige Abwehrbewegungen. Solange die Tiere irritiert waren, verschwand die diskontinuierliche CO₂-Abgabe und der Wasserverlust stieg. Die mittlere, vor der Implantation gemessene CO₂-Abgaberate von 26,6 nmol min⁻¹ g⁻¹ stimmt mit den von GIERTH *et al.* gefundenen Werten gut überein [L61][L62]. Die Stoffwechselrate in der Mitte der Puppenentwicklung scheint sich auch über Generationen hinweg nicht zu ändern.

Die Implantation der Elektroden stellt für die Puppen einen schwerwiegenden Eingriff dar, der zu einer Erhöhung des Stoffwechsels um das 1,4-fache führt. In der Folge verkürzt sich der Atemzyklus. Häufig wird auf kontinuierlichen Gasaustausch umgeschaltet. Auch in früheren Arbeiten wurde von zum Teil dramatisch gestiegenen Stoffwechselraten berichtet, die durch

Verletzungen verursacht wurden. SCHNEIDERMAN & WILLIAMS verletzten diapausierende Schmetterlingspuppen und verzeichneten einen bis zu achtfach erhöhten Stoffwechsel, der sich erst nach einigen Tagen wieder normalisierte [L159][L160]. Bei *Tenebrio molitor* wurde durch Verletzungen und in die Hämolymphe eingedrungene Substanzen, die für die Phagozytose zu groß waren, die Synthese antimikrobieller Proteine induziert und die Prophenoloxidase aktiviert, die bei der Zellaggregation mitwirkt [L31]. Als Folge stieg der Stoffwechsel.

Auch wenn die Puppen in dieser Arbeit möglichst schonend behandelt wurden, muss dennoch damit gerechnet werden, dass pathologische Mechanismen Einfluss auf die Ergebnisse nehmen. Die Implantation der Elektroden wurde stets an derselben Stelle des Pronotums ausgeführt, um Variabilitäten durch Lageveränderungen zu minimieren. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Puppengrößen oder individuelle morphologische Unterschiede eine leicht veränderte Lagebeziehung der Elektroden zu den umliegenden Organen verursachten, die sich letztendlich auf die pH-Messungen auswirkten.

Da der Säure-Basen-Status unabhängig vom Alter der Puppen war, wurden die Messungen *in vivo* stellvertretend für das gesamte Puppenstadium auf Versuchstiere im Alter von 3 - 5 Tagen beschränkt. In dieser Zeit erreichte der Stoffwechsel ein Minimum und die Stoffwechselrate der Puppen zeigte die geringsten Schwankungen (siehe Abb. 1.2 auf Seite 3).

4.9 Untersuchungen *in vivo*: Ergebnisse

Diskontinuierliche Kohlendioxidabgabe. Die diskontinuierliche Kohlendioxidabgabe der Puppen von *Zophobas* unterscheidet sich von den Abgabemustern anderer Insekten. Die diapausierenden Puppen des Schmetterlings *Hyalophora cecropia* zeigen einmal in drei Tagen eine Öffnungsperiode von 30 Minuten [L156]. PUNT *et al.* untersuchten die diskontinuierliche CO₂-Abgabe von *Carabus* bei 20 °C. Sie beobachteten etwa drei Bursts pro Stunde, wobei die Interburstperioden so lange dauerten wie die Bursts [L145]. Dagegen zeigten die hier untersuchten Käferpuppen ein kurze Zyklusdauer von etwa neun Minuten vor und 4,5 Minuten nach der Implantation der pH-Elektroden. Die Öffnungsperioden dauerten etwa 1,2 - 1,4 Minuten.

Vergleicht man die Zyklusdauer unterschiedlicher Insekten, so zeigt sich, dass sie von der mittleren CO₂-Abgaberate abhängig ist. Große Insekten mit einer niedrigen Stoffwechselrate haben lange Respirationszyklen (Schmetterlingspuppen in Abb. 4.15), wogegen kleine Insekten sehr kurze Zyklen aufweisen. Dieser Zusammenhang ist nicht temperaturabhängig.

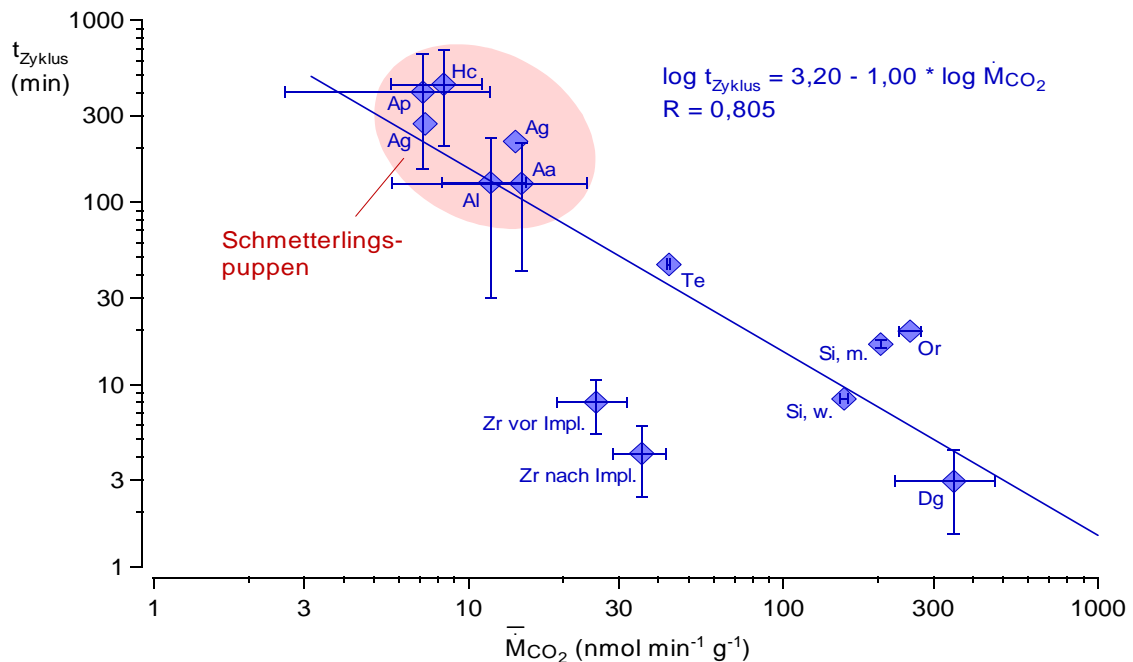


Abbildung 4.15 Zyklusdauer und mittlere CO_2 -Abgaberate einiger Insekten. Zyklusdauer und Stoffwechselrate zeigen einen doppelt logarithmischen Zusammenhang. Aa: *Attacus atlas*, Al: *Attacus lorquinii*, HETZ, 1994 [L82]; Ag: *Agapema galbina*, BUCK & KEISTER, 1955 [L20]; Ap: *Antheraea pernyi*, KAISER *et al.*, 1996 [L95]; Hc: *Hyalophora cecropia*, SCHNEIDERMAN & WILLIAMS, 1955 [L160]; Te: *Taeniopoda eques*, HARRISON *et al.*, 1995 [L73]; Si: *Solenopsis invicta* (männl. und weibl. Alate) VOGT & APPEL, 2000 [L180]; Om: *Onymacris marginipennis* CHOWN, 2001 [L32]; Dg: *Dasymutilla gloriosa*, DUNCAN & LIGHTON, 1997 [L46]; Zr: *Zophobas rugipes*, diese Arbeit, vor und nach Implantation der Elektroden.

Die Puppen von *Zophobas* reagieren auf die zugefügte Verletzung bei der Elektrodenimplantation mit einer Erhöhung der Stoffwechselrate. Dies erfordert eine Anpassung der diskontinuierlichen CO_2 -Abgabe. Aus diesem Grund wird die Zyklusdauer auf Kosten der Interburstperiode verkürzt (Siehe “ CO_2 -Abgabe” auf Seite 39.). Die Verkürzung der Zyklusdauer wurde bereits durch GIERTH *et al.* an unbeeinflussten Puppen untersucht [L61][L62]. In einigen Fällen überlagern sich die Öffnungsperioden so stark, dass ein kontinuierliches Kohlendioxidssignal registriert wird.

Es wird allgemein angenommen, dass die Öffnungsperiode durch Erreichen eines CO_2 -Schwellenwerts ausgelöst wird, der mit der Anreicherung von CO_2 im Organismus zusammenhängt. Wie WOBSCALL gezeigt hat, wird bei Puppen von *Zophobas* die Konstriktionsperiode durch Hypoxie verkürzt und die Flutterperiode verlängert. Die Zyklusdauer bleibt dagegen unbeeinflusst [L186]. Das bedeutet, dass Puppen, denen Elektroden implantiert wurden, und die dadurch die Zyklusdauer verkürzten, eher einer Hyperkapnie als einer Hypoxie ausgesetzt waren. Während GIERTH keine veränderte Charakteristik der Öffnungsperioden bei Stoffwechselraten von 20 - 40 nmol g min^{-1} entdecken konnte, sind in dieser Arbeit Unterschiede feststellbar: Die Öffnungsperioden werden bei höheren Stoffwechselraten kürzer und die pro Burst abgegebene CO_2 -Menge wird geringer (Siehe “ CO_2 -Abgabe” auf Seite 39.). Da die CO_2 -Abgabe in der Öffnungsperiode diffusiv erfolgt und dem Fickschen Diffusionsgesetz unterliegt, gibt die Beurteilung der maximalen Abgaberate Aufschluss über die beiden veränderlichen Parameter Diffusionsfläche und CO_2 -Partialdruckdifferenz zwischen Tracheensy-

stem und Umgebung. Die Diffusionsfläche entspricht dabei der Fläche aller beim Burst geöffneten Stigmen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Maxima der Abgaberraten bei gleichen Stoffwechselraten teilweise reduziert sind, teilweise aber auch höher liegen, als vor der Implantation (Abb. 4.16).

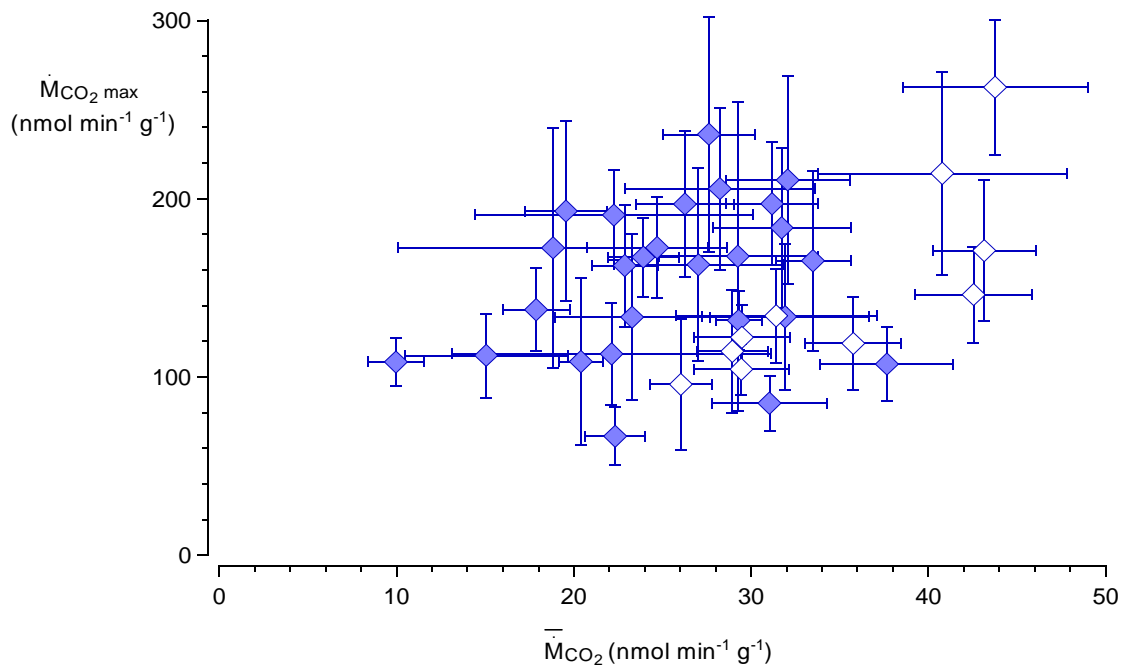


Abbildung 4.16 Zusammenhang zwischen mittlerer Stoffwechselrate und mittlerer maximaler CO_2 -Abgaberrate während der Öffnungsperioden bei Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen vor ($N = 26$, gefüllte Rauten) und nach ($N = 10$, offene Rauten) der Elektrodenimplantation.

Da nicht zu erwarten ist, dass die Puppen nach der Verletzung weniger Stigmen einsetzen als vorher, sind die niedrigen Maxima ein Zeichen für einen gesunkenen Partialdruck im Tracheensystem. Die Erhöhung der maximalen Abgaberrate nach Elektrodenimplantation lässt sich durch stärkere oder vermehrte Öffnung von Stigmenverschlüssen erklären.

Die Stoffwechselerhöhung stellt für die Puppen von *Zophobas* primär ein Hyperkapnieproblem dar. Das Problem wird durch Verkürzen der Zyklusdauer oder Öffnen einer größeren Stigmenzahl kompensiert. Die Verkürzung der Zyklusdauer hat zur Folge, dass die Gewebe über das Tracheensystem ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden können. Die geringe Puppengröße ist dabei ein Vorteil bei der diffusiven Versorgung. Solange die respiratorischen Veränderungen genügen, sind keine metabolischen Kompensationsmechanismen notwendig, um sich der veränderten Stoffwechsellage anzupassen. Die Vermutung von GIERTH *et al.* [L61][L62], dass sich die Parameter des Säure-Basen-Status während der Entwicklung der Puppen nicht ändern, wird durch die vorliegenden Ergebnisse *in vitro* und *in vivo* bestätigt (siehe Kapitel 3.18 auf Seite 38 und Kapitel 4.6 auf Seite 77).

pH-Wert. Erste Messungen des pH-Werts von Insektenhämolymphe erfolgten bereits in den Zwanziger Jahren des 20. Jahrhunderts. BISHOP fand bei Honigbienenlarven mit einer Wasserstoffelektrode pH-Werte von 6,75 bis 6,85 und eine Ansäuerung auf Werte um 6,6 während des Spinnens [L13]. BODINE untersuchte 1926 17 Heuschreckenarten mit einer Mikrowasserstoff-

elektrode und fand pH-Werte von 6,43 - 7,05 bei *Chortophaga*, 6,9 - 6,98 bei *Melanoplus* und 6,4 - 6,8 bei *Romalea* [L15]. HELLER & MOKLOWSKA fanden 1930 bei der Wolfsmilchschwärmerpuppe *Deilephila euphorbiae* pH-Werte von 6,45 - 6,64 mit der Chinhydronmethode [L80].

Eine der ersten Arbeiten, die sich ausführlich mit dem Zusammenhang zwischen der Entwicklung der Insekten und dem pH-Wert befasste, wurde 1932 von DEMJANOWSKI und seinen Mitarbeitern durchgeführt. Die mit der Chinhydronmethode durchgeführte pH-Messung während der Entwicklung des Seidenspinners *Bombyx mori* zeigte, dass der pH-Wert während der Raupenentwicklung stetig von 7,0 auf 6,7 sank. Bei jeder Larvenhäutung stieg der pH-Wert kurzfristig um ca. 0,2 Einheiten an [L41]. KOCIAN & ŠPÁČEK führten 1934 eine systematische Untersuchung des pH-Werts in der Hämolymphe etlicher Käfer durch [L102]. Sie schlossen aus den Ergebnissen, dass der pH-Wert der Hämolymphe von Coleopteren nach Art und Alter zwischen 6,2 und 7,2 liegt und dass Fleischfresser in der Regel einen höheren pH-Wert besitzen als Pflanzenfresser. Frisch geschlüpfte Imagines von *Tenebrio molitor* haben mit 6,25 - 6,35 einen wesentlich geringeren pH-Wert als die adulten Käfer (pH-Wert 7,0 - 7,2). Die Autoren konnten weder Geschlechtsunterschiede noch Unterschiede durch Nahrungsangebot oder Lebensbedingungen erkennen [L102]. TAYLOR *et al.* untersuchten den pH-Wert der Hämolymphe von *Galleria melonella* bei 30 °C. Dieser sinkt während der Puppenentwicklung von ca. 6,55 auf unter 6,0 und steigt zum Ende des Puppenstadiums wieder an. Zum ersten Mal wurde eine Glaselektrode verwandt, mit dem Hinweis auf bessere Bedienbarkeit und höhere Genauigkeit gegenüber Wasserstoff- oder Chinhydronelektroden [L169].

Die erste exakte Analyse des pH-Werts durch Probenentnahme wurde von HARRISON an Orthopteren durchgeführt. Er bestimmte mithilfe einer thermostatisierten Glaselektrode eines Blutgasanalysators mittlere Hämolymphe-pH-Werte von 6,95 bei *Schistocerca nitens* [L69], 7,05 bei *Schistocerca gregaria* [L71], 7,12 bei *Melanoplus bivittatus* [L68] und 7,31 bei *Schistocerca americana* [L65], die deutlich höher lagen als 1926 von BODINE gemessen [L15].

Die erste Messung des pH-Werts *in vivo* gelang HETZ 1990 mit selbst konstruierten pH-Glaselektroden, die in die Versuchstiere implantiert wurden [L81]. Er untersuchte die Hämolymphe verschiedener Schmetterlingspuppen und erhielt Ergebnisse von 6,437 - 6,847 bei *Troides rhadamantus plateni*, 6,419 - 6,587 bei *Ornithoptera priamus poseidon* und 6,319 - 6,526 bei *Attacus atlas* [L82].

Aus all diesen Arbeiten wird deutlich, dass in der Insektenhämolymphe im Vergleich zu Wirbeltierblut niedrige pH-Werte in Bereichen vorherrschen, die für Vertebraten teilweise letal wären. Die Puppen von *Zophobas* bilden mit dem in dieser Arbeit gemessenen pH-Wert der Hämolymphe zwischen 6,651 und 7,111 keine Ausnahme und fügen sich in das von KOCIAN & ŠPÁČEK postulierte Schema ein [L102].

Zyklische pH-Wert-Änderungen durch diskontinuierliche CO₂-Abgabe. Im Gegensatz zur kontinuierlichen CO₂-Abgabe schwankt der pH-Wert bei der diskontinuierlichen CO₂-Abgabe rhythmisch mit den Perioden des Atemzyklus. Diese rhythmischen Änderungen können erst durch die *in vivo*-Messung sichtbar gemacht werden. Die einzige *in vivo* Messung des pH-Werts bei Insekten vor dieser Arbeit wurde von HETZ an Schmetterlingspuppen durchgeführt [L81][L82].

Da der pH-Wert eine exponentielle Größe darstellt, sind nach der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung Zusammenhänge mit dem Logarithmus der in der Öffnungsperiode abgegebenen CO_2 -Menge zu erwarten. Sowohl bei den Puppen von *Troides* als auch bei den Puppen von *Zophobas* ist diese Abhängigkeit feststellbar (Abb. 4.17).

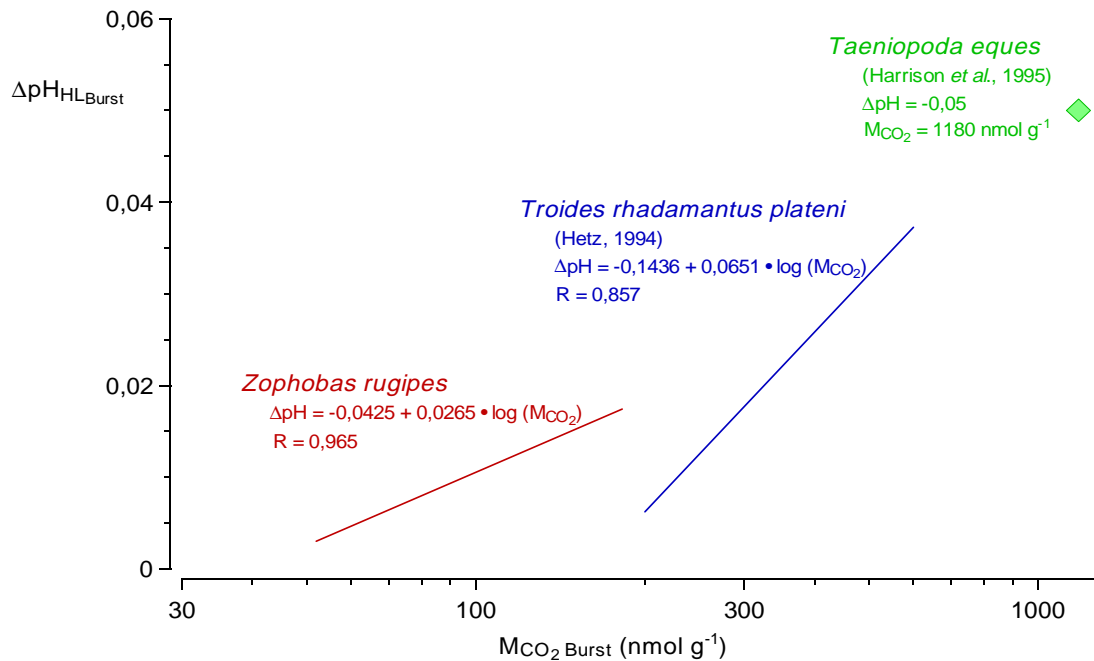


Abbildung 4.17 Zusammenhang zwischen Anstieg des pH-Werts in der Hämolymphe und Stoffmenge des in der Öffnungsperiode abgegebenen Kohlendioxids bei Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*, des Vogelflügelfalters *Troides rhadamantus plateni* (HETZ, 1994 [L82]) und des Heupferds *Taeniopoda eques* (HARRISON *et al.*, 1995 [L73]). Dargestellt sind Regressionsfunktionen der *in vivo*-Versuche (*Zophobas*: N = 10, n = 1710, *Troides*: N = 4, n = 82) und Mittelwerte der *in vitro*-Versuche (*Taeniopoda*: Burst: N = 24, n = 2-3 pro Tier, ΔpH: N = 8). Bei den Versuchen *in vivo* zeigt sich ein halblogarithmischer Zusammenhang, jedoch mit unterschiedlicher Kinetik. Bei *Zophobas* ist die im Burst abgegebene CO_2 -Mengen wesentlich geringer und die pH-Änderungen kleiner (N: Anzahl der Puppen, n: Anzahl der Bursts).

Während bei *Troides* aber größere CO_2 -Mengen und pro CO_2 -Menge auch größere Zunahmen des pH-Werts zu verzeichnen sind, geben Puppen von *Zophobas* geringere CO_2 -Mengen ab und der pH-Wert steigt pro abgegebener CO_2 -Menge auch weniger an. Pro 100 nmol CO_2 steigt der pH-Wert bei *Zophobas* um etwa 0,01 Einheiten. Neben diesen beiden Untersuchungen mit implantierten pH-Elektroden existiert noch eine weitere quantitative Analyse der Säure-Basen-Parameter der Hämolymphe vor und nach der einer Öffnungsperiode *in vitro*. Sie wurde 1995 durch HARRISON *et al.* am Heupferd *Taeniopoda eques* durchgeführt: durch eine mittlere Abgabe von 1180 nmol g^{-1} stieg der pH-Wert in Proben von Hämolymphe um 0,05 Einheiten von 7,24 auf 7,29 [L73].

Um den Einfluss der CO_2 -Abgabe auf pH-Wert-Änderungen der Hämolymphe untersuchen zu können, muss der Anteil des aus der Hämolymphe stammenden Kohlendioxids berechnet werden. Das im Durchflussrespirometer während der Öffnungsperiode abgegebene CO_2 stammt aus Tracheensystem, Hämolymphe und Gewebe der Puppen:

$$M_{\text{CO}_2 (\text{Burst})} = M_{\text{CO}_2 (\text{Tr})} + M_{\text{CO}_2 (\text{HL})} + M_{\text{CO}_2 (\text{Gew})} \quad (\text{Gleichung 16})$$

Im Mittel werden nach der Implantation pro Burst etwa $100 \text{ nmol g}^{-1} \text{ CO}_2$ abgegeben (Abb. 3.19 auf Seite 41). Das durchschnittliche Puppengewicht beträgt etwa $0,6 \text{ g}$ ("Gewicht der Versuchstiere" auf Seite 23). Daraus ergibt sich eine Stoffmenge von 60 nmol CO_2 .

Die CO_2 -Stoffmenge, die aus dem Kompartiment x stammt, errechnet sich aus dem Volumen des Kompartiments V_x , dem Löslichkeitskoeffizienten für Kohlendioxid $\beta_{\text{CO}_2(x)}$ und der Partialdruckdifferenz zwischen Beginn und Ende des Bursts ΔP_{CO_2} :

$$M_{\text{CO}_2(x)} = V_x \cdot \beta_{\text{CO}_2(x)} \cdot \Delta P_{\text{CO}_2} \quad (\text{Gleichung 17})$$

Die Volumina von Hämolymphe und Gewebe wurden in dieser Arbeit bestimmt, das Volumen des Tracheensystems wurde durch WOBSCALL indirekt bestimmt und mit etwa $57 - 85 \text{ } \mu\text{l g}^{-1}$ angegeben [L186]. Für die Modellpuppe von $0,6 \text{ g}$ resultiert daraus ein Tracheenvolumen von $50 \text{ } \mu\text{l}$.

Die CO_2 -Partialdruckdifferenz wurde nicht gemessen und muss aus diesem Grund aus der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung abgeleitet werden:

$$\Delta P_{\text{CO}_2} = P_{\text{CO}_2\text{vor}} - P_{\text{CO}_2\text{nach}} = \left(\frac{[\text{HCO}_3^-]_{\text{vor}}}{\alpha \cdot 10^{pH_{\text{vor}} - pK}} \right) - \left(\frac{[\text{HCO}_3^-]_{\text{nach}}}{\alpha \cdot 10^{pH_{\text{nach}} - pK}} \right) \quad (\text{Gleichung 18})$$

Aus Abb. 4.17 kann bei $100 \text{ nmol g}^{-1} \text{ CO}_2$ ein Anstieg des Hämolymphe-pH-Werts um $0,01$ Einheiten abgelesen werden. Der mittlere pH-Wert liegt bei $6,94$ vor und $6,95$ nach der Öffnungsperiode. Die Bikarbonatkonzentrationen lassen sich aus dem Pufferwert der Nichtbikarbonatpuffer berechnen:

$$[\text{HCO}_3^-] = \beta_{\text{NB}} \cdot pH \quad (\text{Gleichung 19})$$

Daraus ergeben sich Bikarbonatkonzentrationen von $16,32 \text{ mmol l}^{-1}$ vor und $16,17 \text{ mmol l}^{-1}$ nach dem Burst. Die Differenz beträgt $0,15 \text{ mmol l}^{-1}$. Der P_{CO_2} beträgt $6,75 \text{ kPa}$ vor und $6,53 \text{ kPa}$ nach dem Burst, dies entspricht einer Abnahme von $0,22 \text{ kPa}$. Mithilfe der CO_2 -Sättigungsfunktion *in vitro* aus Kapitel 3.16 auf Seite 35 kann aus dem P_{CO_2} die Konzentration von CO_2 in der Hämolymphe berechnet werden. Es ergeben sich $18,88 \text{ mmol l}^{-1}$ vor und $18,62 \text{ mmol l}^{-1}$ nach dem Burst. Das mittlere Hämolymphevolumen in der Mitte des Puppenstadiums beträgt etwa $180 \text{ } \mu\text{l}$ ($27,5 \%$ Hämolymphewasseranteil am Gesamtgewicht und Dichte von $1,03 \text{ g ml}^{-1}$). Die Gesamtstoffmenge von CO_2 in der Hämolymphe beträgt damit 3398 nmol vor dem Burst und 3352 nmol nach dem Burst. Die Differenz von 46 nmol CO_2 entspricht etwa 77% des gesamten in einem Burst abgegebenen Kohlendioxids (60 nmol , siehe oben). Die restlichen 25% gelangen aus dem Tracheensystem und aus dem Gewebe in die Umgebung.

Setzt man ein Äquilibrium zwischen allen Kompartimenten voraus, dann fällt der CO_2 -Partialdruck während des Bursts auch im Tracheensystem um $0,22 \text{ kPa}$. Da der Löslichkeitskoeffizient von CO_2 in Luft $0,42 \text{ nmol } \mu\text{l}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ beträgt, entsprechen $0,22 \text{ kPa}$ einer Konzentrationsänderung von $92 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$. Die Stoffmenge an CO_2 , die aus dem oben berechneten Tracheenvolumen von $50 \text{ } \mu\text{l}$ stammt, beträgt $4,5 \text{ nmol}$ oder knapp 7% der gesamten Kohlendi-

oxidmenge im Burst. Damit ergibt sich folgende CO_2 -Bilanz des Bursts: gesamte CO_2 -Abgabe 60 nmol, aus Tracheensystem 4,5 nmol (7 %), aus Hämolymphe 46 nmol (77 %), aus Gewebe 9,5 nmol (16 %).

HARRISON *et al.* haben für Öffnungsperioden bei *Taeniopoda eques* einen Partialdruckabfall von 0,46 kPa in der Hämolymphe berechnet [L73]. Bei einer CO_2 -Menge im Burst von 2,6 μmol stammen dabei 0,2 μmol , also etwa 7,7 % aus dem Tracheensystem. Der Anteil des Kohlendioxids, der in den Öffnungsperioden aus dem Tracheensystem von Schmetterlingspuppen stammt, wird von HETZ mit 10 % kalkuliert und von BRIDGES & SCHEID mit 2 % angegeben [L82][L18]. Der Anteil von CO_2 aus dem Tracheensystem ist damit bei den bisher untersuchten Insekten und *Zophobas rugipes* vergleichbar gering.

Der CO_2 -Anteil aus dem Gewebe von Tagfalterpuppen wurde von HETZ auf über 50 % kalkuliert [L82] und ist mehr als dreimal so hoch wie bei Puppen von *Zophobas* (16 %). Aus der Hämolymphe der Tagfalterpuppen stammten mit 40 % des abgegebenen Kohlendioxids weniger als bei *Zophobas*. Die Hämolymphe besitzt bei allen untersuchten Insekten eine wichtige Rolle als CO_2 -Reservoir in der Interburstperiode. Möglicherweise spielt die Hämolymphe bei *Zophobas* jedoch eine größere Rolle bei der Speicherung als die von Schmetterlingspuppen.

In früheren Arbeiten wurden weitaus größere Partialdruckunterschiede als 0,22 kPa im Tracheensystem gemessen: LEVY & SCHNEIDERMAN zeigten durch Analyse von Luftproben aus dem Tracheensystem, dass der Anteil des Kohlendioxids während einer Öffnungsperiode von 6 auf 3,5 % sank [L116]. HETZ berechnete aus den CO_2 -Abgaberaten zu Beginn und zu Ende der Öffnungsperioden bei Schmetterlingspuppen einen Partialdruckunterschied von bis zu 60 % [L82]. Bei einem berechneten P_{CO_2} von 6,75 kPa in den Puppen von *Zophobas* (siehe Gleichung 18) müßte die Partialdruckdifferenz etwa 3,7 kPa betragen und damit deutlich mehr als die errechneten 0,22 kPa. Entweder sind die Partialdruckschwankungen im Tracheensystem von *Zophobas* tatsächlich nicht so groß, oder es besteht ein Disäquilibrium zwischen den Kompartimenten, das erst nach der Öffnungsperiode wieder ausgeglichen wird [L73][L82]. Dieses Disäquilibrium läßt sich durch die *in vivo* Versuche direkt nachweisen: in allen Versuchen dauert der Anstieg des pH-Werts länger als die Abgabe des Kohlendioxids in der Öffnungsperiode (Abb. 4.18). Kohlendioxid gelangt folglich auch nach dem Schließen der Stigmen aus der Hämolymphe in das Tracheensystem und führt dort zu einem Ausgleich des in der Öffnungsperiode entstandenen Partialdruckunterschieds. Da die Dauer des pH-Wert-Anstiegs im Durchschnitt nur 13 % länger ist als die Burstdauer, ist das Disäquilibrium allerdings nicht besonders stark ausgeprägt und wird schnell wieder ausgeglichen.

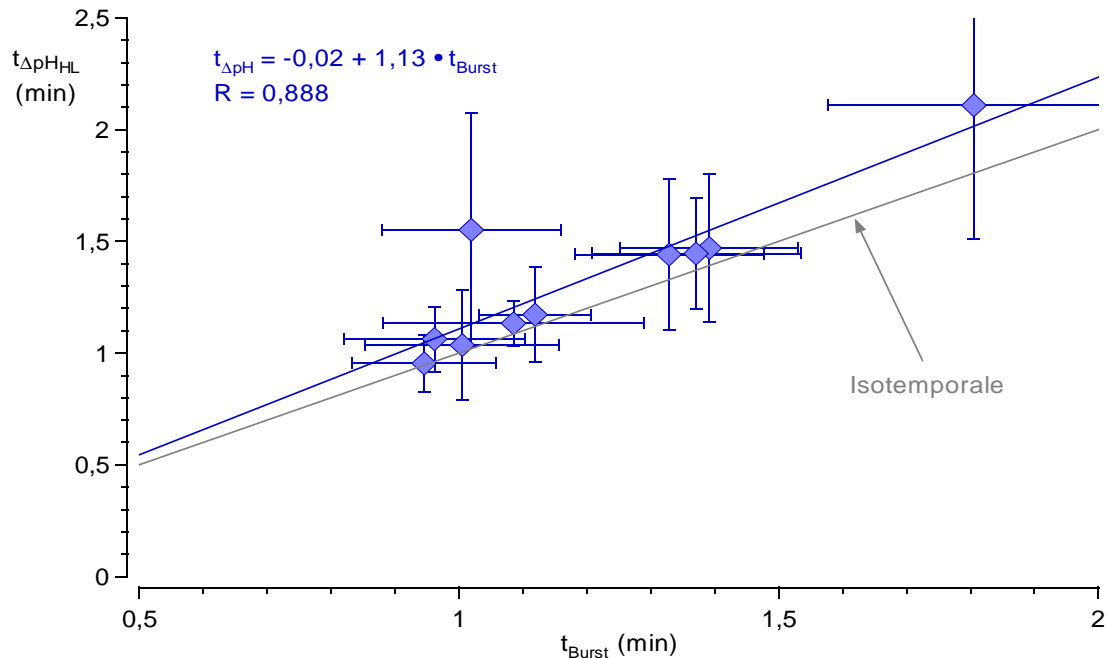


Abbildung 4.18 Zusammenhang zwischen Dauer des pH-Wert-Anstiegs und Dauer der CO_2 -Abgabe während der Öffnungsperiode bei Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen ($N = 10$, $n = 26 - 257$). Der pH-Anstieg dauert stets länger als die CO_2 -Abgabe. Dies deutet auf ein Disäquilibrium zwischen Tracheensystem und Hämolymphe nach dem Ende der Öffnungsperiode hin, das während der folgenden Interburstperiode ausgeglichen wird.

Hyperkapnie und Säure-Basen-Status *in vivo* nach Implantation der Elektroden.

HARRISON *et al.* haben 1995 bei *Taeniopoda eques* festgestellt, dass bei den Versuchstieren erst ab einem Umgebungspartialdruck von 2,9 kPa Kohlendioxid die Stigmen kontinuierlich geöffnet bleiben [L73]. Bei Puppen der Vogelflügelfalter *Ornithoptera* wurden *in vivo* CO_2 -Partialdrucke von 0,9 bis 2,9 kPa, bei *Attacus atlas* von 2,1 - 6,6 kPa gemessen [L82]. Der P_{CO_2} in Insekten überspannt demnach einen weiten Bereich und ist ein Grund für die unterschiedlichen pH-Werte, die bisher in der Hämolymphe gemessen wurden. Aus den Hyperkapnieversuchen lässt sich folgern, dass der P_{CO_2} in der Hämolymphe von *Zophobas* im unbeeinflussten Zustand zwischen 1 und 3,7 kPa liegt, da sich bei 1 kPa keine und erst bei 3,7 kPa eine deutliche Ansäuerung der Hämolymphe zeigt, und die für die diskontinuierliche CO_2 -Abgabe typischen Schwankungen des pH-Signals verschwinden.

Die aus externem P_{CO_2} und den minimalen pH-Werten der Hämolymphe berechneten Bikarbonatkonzentrationen sind bei gleichen CO_2 -Partialdrücken *in vivo* wesentlich geringer als *in vitro*. Ein Absinken der Bikarbonatkonzentration ist meist die Folge einer kompensierten metabolischen Azidose, in deren Folge entstehende Protonen sich mit dem Bikarbonat verbinden und zu CO_2 reagieren. Dieses CO_2 kann abgeatmet werden. HARRISON *et al.* haben der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* Salzsäurelösungen injiziert und festgestellt, dass die folgende Azidose zunächst respiratorisch kompensiert wurde [L72]. Vertreter der Arachniden produzierten bei Aktivität große Mengen Laktat, die zu einer Ansäuerung der Hämolymphe führten. Die respiratorische Kompensation in der Erholungsphase bewirkte eine Verminderung der Bikarbonatkonzentration [L136].

Für eine metabolische Azidose bei den Puppen von *Zophobas* spricht, dass die Messung des pH-Werts der Hämolymphe unmittelbar nach Implantieren der Elektrode stets mit sehr niedrigen Werten begann. Die Azidose kann verschiedene Ursachen haben:

Entweder setzte die Implantation der Elektroden Abwehrmechanismen in Gang, die durch enzymatisch katalysierte Reaktionen erfolgten. Bei diesen Abwehrreaktionen werden Protonen freigesetzt, die zu einer Azidose in der Hämolymphe führen [L31]. Oder die Implantation verursachte eine Stoffwechselerhöhung bei den Puppen, die so erheblich war, dass die Sauerstoffversorgung nicht mehr gewährleistet wurde. Als Folge fand anaerober Stoffwechsel statt und organische Säuren wurden produziert.

Die während der metabolischen Azidose gebildeten Protonen wurden durch Bikarbonat gepuffert und in Kohlendioxid umgewandelt. Die Anreicherung von CO_2 führte zu einem Anstieg des P_{CO_2} . In der Folge nahmen die CO_2 -Abgaberraten und die während der Öffnungsperioden erreichten Fluxmaxima kurz nach der Elektrodenimplantation deutlich zu (siehe Abb. 3.17 auf Seite 39). Die Azidose wurde kompensiert. Erst nachdem der pH-Wert im weiteren Verlauf des Versuchs auf höhere Werte angestiegen war, sank auch die Abgaberrate.

Die Messung des Hämolymphe-pH-Werts während Hyperkapnie ergab, dass sich der einmal erreichte minimale pH-Wert nicht mehr änderte, so lange die Hyperkapnie anhielt. Allem Anschein nach tolerierten die Puppen von *Zophobas* die respiratorische Azidose und kompensierten nicht. Dieses Phänomen steht im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Hyperkapnieversuche. Beim Hai *Scyliorhinus stellaris* wurde beobachtet, dass ein Absinken des pH-Werts im Plasma, das durch erhöhte CO_2 -Partialdrucke im Wasser verursacht wurde, durch transepitheliale Ionentransferprozesse kompensiert wurde (HEISLER *et al.*, 1976 [L79]). Wurden Puppen des Atlaspinner *Attacus atlas* über mehrere Stunden hyperkapnischen Atmosphären ausgesetzt, stieg der pH-Wert der Hämolymphe nach Erreichen eines Minimums allmählich wieder an (Abb. 4.19, [L97]). In beiden Experimenten nahm der pH-Wert des untersuchten Kompartiments spätestens eine Stunde nach Einstellen hyperkapnischer Bedingungen wieder zu.

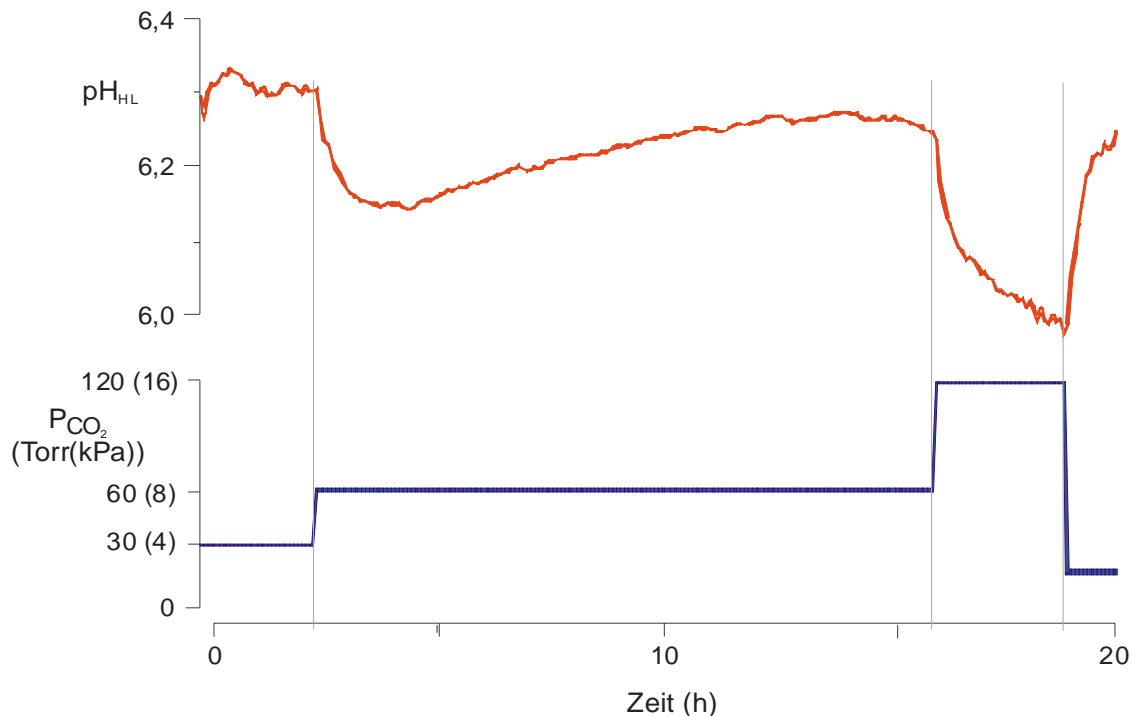


Abbildung 4.19 pH-Wert in der Hämolymphe von Puppen des Seidenspinners *Attacus atlas* in Abhängigkeit vom externen CO_2 -Partialdruck. Kurze Zeit nach Erhöhung des Partialdrucks auf 8 kPa beginnt der pH-Wert der Hämolymphe anzusteigen. Er erreicht nach mehreren Stunden ein Plateau, dessen Wert unter dem pH-Wert bei niedrigerem CO_2 -Partialdruck liegt (Daten aus [L97]).

In der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas* war keine Zunahme des pH-Werts nach Erreichen des pH-Minimums während Hyperkapnie messbar (s. Abb. 3.26 in Kapitel 3.18 auf Seite 46). Diese Beobachtung kann durch zwei alternative Hypothesen erklärt werden:

Der hyperkapnische Zustand wurde toleriert. Der CO_2 -Partialdruck im Tier nahm stoffwechselbedingt so lange zu, bis ein Partialdruckgradient nach außen entstand und Kohlendioxid wieder abgegeben werden konnte.

Die Kompensation der respiratorischen Azidose erfolgte zeitgleich mit dem Auftreten der Hyperkapnie und war nach Erreichen des apparenten minimalen pH-Werts in der Hämolymphe bereits vollständig abgeschlossen.

Wie an dem Beispielexperiment (Kapitel 3.18 auf Seite 46, Abb. 3.26) zu erkennen ist, verging bis zum Erreichen des minimalen pH-Werts eine Zeitspanne von einer bis zu mehreren Stunden. Durch die Kalibrierung mithilfe einer P_{CO_2} -Elektrode wurde vor den Versuchen festgestellt, dass 90 % des anvisierten Partialdrucks nach etwa 7 Minuten, und 99 % nach etwa 21 Minuten erreicht waren. Die CO_2 -Äquilibration der Versuchskammer erfolgte demnach wesentlich schneller als die Verringerung des pH-Werts. Dass das pH-Wert-Minimum zeitverzögert erreicht wurde, könnte durch verschlossene Stigmen oder den Diffusionswiderstand von Stigmen und Tracheensystem verursacht worden sein. Bei präparierten Puppen von *Zophobas* war ein respiratorischer Zyklus nach 4 - 6 Minuten beendet und die Stigmen mussten zur CO_2 -Abgabe geöffnet werden, so dass lange Verschlusszeiten der Stigmen ausgeschlossen werden können. Da die CO_2 -Abgabe in der kurzen Zeitspanne von etwa einer Minute erfolgte,

ist anzunehmen, dass der Diffusionswiderstand zwischen Hämolymphe und Umgebungsluft gering ist. Die Verzögerung des pH-Minimums wurde demnach nicht durch Diffusionslimitierung verursacht.

Plausibler ist, dass Kompensationsmechanismen wirkten, während der pH-Wert im hyperkapnischen Zustand absank. Diese waren im Experiment jedoch nicht als pH-Anstieg zu beobachten, da sie bereits während der Äquilibrierungsphase abgeschlossen waren. Da die Puppen von *Zophobas* auch bei 15 °C eine relativ hohe Stoffwechselrate besitzen, und nicht wie die Puppen von *Attacus atlas* in einer stoffwechselarmen Diapause verharren, können sie auf Umwelteinflüsse schnell reagieren. Es gibt für diese Annahme zwei Belege:

1. Der pH-Wert der Hämolymphe erreichte nach Beenden der Hyperkapnie oft höhere Werte als zu Beginn des Versuchs (siehe Abb. 3.29 in Kapitel 3.18 auf Seite 49). Durch die allmählich zunehmende respiratorische Azidose wurden Ionentransferprozesse aktiviert, die einen Teil der Protonen aus dem Kompartiment entfernen. Dadurch stieg der pH-Wert. HARRISON *et al.* zeigten an der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria*, dass eine Azidose der Hämolymphe, die durch Injektion von Salzsäurelösung verursacht wurde, hauptsächlich durch den Transport von Protonen in den Verdauungstrakt kompensiert wurde [L72]. Auch die auf Ionentransportvorgänge spezialisierten Malpighischen Gefäße tragen zur Kompensation bei. Da Darm und Malpighische Gefäße während des gesamten Puppenstadiums von *Zophobas rugipes* vollständig erhalten bleiben, sind die Voraussetzungen für eine Beteiligung dieser Organe an einer Kompensation gegeben.

2. Der Pufferwert *in vivo* war um den Faktor 2,2 größer als der Pufferwert, der *in vitro* bestimmt wurde (Vgl. Kapitel 3.17 auf Seite 38 und Kapitel 3.18 auf Seite 49). Die Hämolymphe *in vitro* ist ein isoliertes, zellfreies Kompartiment, in dem keine Ionentransferprozesse stattfinden können. Die Hämolymphe *in vivo* besitzt dagegen Hämozyten und ist umgeben von einer Vielzahl von Geweben, die in der Lage sind, regulierend in den Säure-Basen-Status der Hämolymphe einzugreifen. Als Beispiel sei der von GIORDANA & PARENTI untersuchte Aminosäuretransport aus dem Darmlumen in die Hämolymphe erwähnt, der direkt mit dem Transport von Kalium und Protonen in Verbindung steht [L63]. Auch isoliertes Blutplasma von Wirbeltieren besitzt einen wesentlich geringeren Pufferwert als Vollblut, da die Erythrozyten in den Säure-Basen-Haushalt eingreifen (DAVENPORT, 1974 [L38]; HEISLER, 1982 [L76]). Harrison untersuchte den Pufferwert der Hämolymphe bei *Schistocerca nitens* während kurzzeitiger Hyperkapnie. Der Pufferwert *in vivo* war dabei mit $45,7 \text{ meq l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$ um den Faktor 1,4 höher als der Pufferwert *in vitro* ($32,1 \text{ meq l}^{-1} \text{ pH}^{-1}$ [L69]). Bei den Puppen von *Zophobas* waren also Mechanismen beteiligt, die den Pufferwert der Hämolymphe während Hyperkapnie erhöhen, um die CO_2 -Kapazität dieses für die Kohlendioxidzwischenlagerung wichtigen Kompartiments zu verbessern.

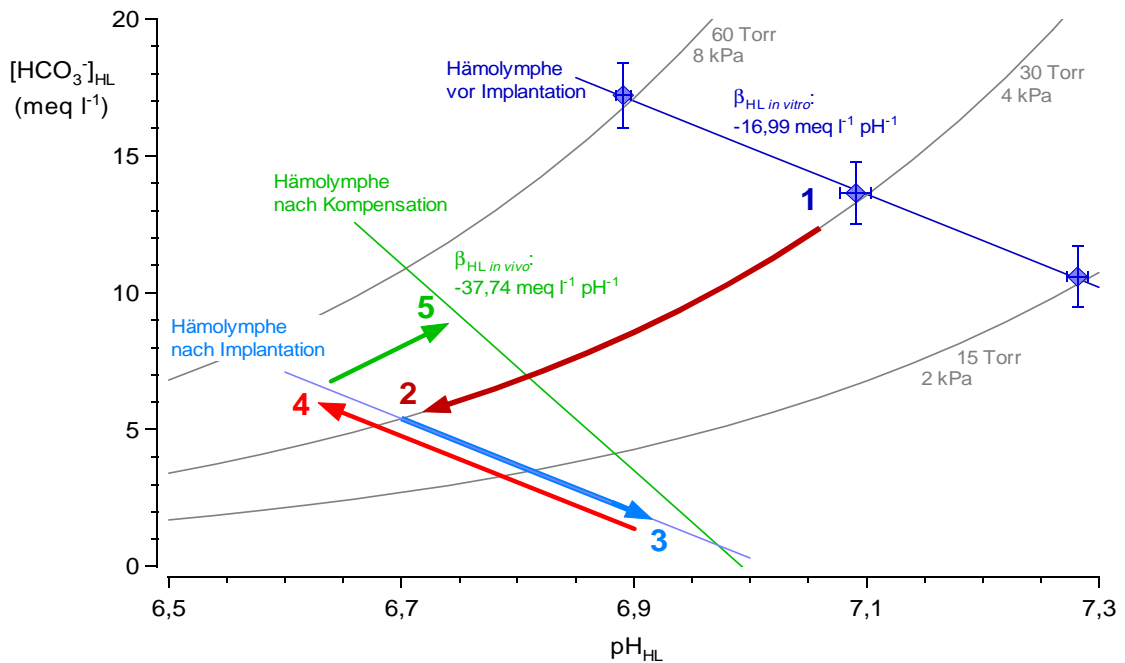


Abbildung 4.20 Hypothetische Prozesse in der Hämolymphe des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* nach Implantation von Elektroden und Hyperkapnie. Ausgehend von der Pufferkurve *in vitro* (1) wird durch die Implantation eine metabolische Azidose verursacht (2), die durch Reaktion von Bikarbonat mit den entstandenen Protonen abgefangen wird. Es folgt eine respiratorische Kompensation durch Abatmen von CO_2 (3). Bei der experimentellen Erhöhung des externen CO_2 -Partialdruckes wird eine respiratorische Azidose ausgelöst (4), die durch Ionentransferprozesse metabolisch kompensiert wird (5). Der Pufferwert der Hämolymphe steigt.

89

beim Heimchen *Achaeta domestica* [L187]. Die Wirkungen von 100 % N₂ und 100 % CO₂ unterschieden sich deutlich: bei 100 % N₂ schlugen die Grillen um sich und pumpen heftig mit dem Abdomen. Bei 100 % CO₂ waren keine Abwehrbewegungen feststellbar. Die Laktatsammlung war am größten in 100 % N₂. Offensichtlich anästhesierte Kohlendioxid die Insekten, bevor der Sauerstoff aufgebraucht wurde. Durch Beenden jeglicher motorischer Aktivität wurde der O₂-Verbrauch reduziert und der Beginn der Anoxie verzögert [L187]. LE CORRONC *et al.* stellten fest, dass Insekten in 100 % CO₂ innerhalb von 10 Minuten ihre ATP-Speicher leerten. Danach blieben sie paralysiert. Der Energieverbrauch wurde durch erhöhte Konzentrationen von inhibitorischen Neurotransmittern wie GABA oder Adenosin reduziert. Die Versuchstiere erholten sich auch nach Stunden langem Sauerstoffmangel vollständig [L107]. Offensichtlich sind Insekten an ein Leben mit hohen CO₂-Partialdrücken angepasst. Ob extreme Hyperkapnie tatsächlich eine Stoffwechseldepression zur Folge hat, muss durch weitere Experimente geklärt werden.

Kontrolle der CO₂-Abgabe. Obwohl bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts erste Untersuchungen zur Atemregulation bei Insekten durchgeführt wurden, wurden weder die Atemzentren lokalisiert, noch die auslösenden Reize ermittelt. Eine der ersten Arbeiten stammt von HAZELHOFF aus dem Jahr 1927 [L74]. Er postulierte durch direkte Applikation von CO₂ auf Stigmen der Schabe *Periplaneta americana*, dass die Regulation der CO₂-Abgabe peripher durch spezielle Rezeptoren an den Stigmen selbst erfolgt. Später zeigten STAHN an der Libellenlarve *Dixippus morosus* und FRAENKEL bei *Schistocerca gregaria*, dass die Thorakalganglien auf eine Erhöhung des CO₂-Gehalts mit erhöhter Aktivität reagierten. Offensichtlich war das Atemzentrum gefunden [L55][L163]. Im Jahr 1956 wies SCHNEIDERMAN bei Puppen von *Hyalophora cecropia* nach, dass die Stigmenbewegungen zwar koordiniert sind, aber kein zentrales Respirationszentrum existiert: Isolierte Abdomina, isolierte anteriore Fragmente und Puppen, denen thorakale oder abdominale Ganglien entfernt wurden, zeigten immer noch diskontinuierliche CO₂-Abgabe [L157]. Während BECKEL & SCHNEIDERMAN 1957 immer noch ein lokales Nervensystem am Stigmenmuskel forderten [L10], zeigte HOYLE 1959, dass die mechanische Aktivität des Stigmenmuskels von *Schistocerca gregaria* nach Durchtrennen des motorischen Nervs sofort endete [L90]. In einer folgenden Arbeit beschrieb er, dass durch lokale Applikation von CO₂ auf den Stigmenmuskel dessen Spannkraft nachließ, der Rhythmus der Entladungen des innervierenden Neurons aber unverändert blieb. Kohlendioxid wirkt nach HOYLE relaxierend auf den Muskel durch lokale Erhöhung der Ionendurchlässigkeit [L91]. Schließlich untersuchte CASE 1961 die Atemkontrolle an der Schabe *Blaberus craniifer*: Isolierte Nervenstränge generierten rhythmische Entladungen, die am Stigmenmuskelnerv gemessen werden konnten und hochempfindlich gegenüber CO₂ waren. Die örtliche Applikation von Kohlendioxid auf ein beliebiges Ganglion intensivierte und beschleunigte den Rhythmus. Die rhythmische Entladung funktionierte nur im Verband mit dem ersten Abdominalganglion und mindestens einem benachbarten Ganglion kaudal und kranial vom untersuchten Segment. Das Atemkontrollzentrum schien die tonischen Motoneurone rhythmisch zu inhibieren. CASE folgerte, dass das Atemkontrollzentrum zentral im Nervensystem liegt, sensitiv auf Protonen und durch eine Barriere isoliert ist, die hauptsächlich für undissoziierte Moleküle permeabel ist [L27].

HETZ postulierte in seiner Arbeit an Schmetterlingspuppen einen tracheenfernen P_{CO_2} -Sensor und begründete dies mit der Regelhysterese eines Sensors, der weit entfernt vom

Ort großer CO_2 -Partialdruckschwankungen liegt [L82]. Die relativ stark streuenden Partialdrucke im Tracheensystem, die HETZ in seiner Arbeit gemessen hatte, würden bedeuten, dass der Schwellenwert in jedem Versuchstier unterschiedlich ist. Die pH-Werte der Hämolymphe von *Zophobas* weisen ebenfalls auf unterschiedliche interne CO_2 -Partialdrucke hin (siehe pH-Bikarbonat-Diagramm Abb. 4.20 auf Seite 89). Ein Sensor, der einen absoluten P_{CO_2} -Wert registriert, ist aus diesem Grund zunächst unwahrscheinlich.

Der Sensor könnte auch auf Änderungen des CO_2 -Partialdrucks reagieren. Die CO_2 -Abgabe im Burst erfolgt diffusiv. Bei niedrigen Partialdrucken in den Puppen würde eine niedrigere CO_2 -Abgaberate in der Öffnungsperiode resultieren. Um die gleichen Partialdruckdifferenzen zu erzielen, sollten die Öffnungsperioden bei niedrigen Partialdrucken länger dauern als bei hohen. Wenn man den in dieser Arbeit gemessenen pH-Wert der Hämolymphe als Ausdruck für den herrschenden P_{CO_2} verwendet, sollten die Öffnungsperioden mit steigendem pH-Wert länger dauern, oder zumindest nicht kürzer werden. Zwischen pH-Wert und Dauer der Öffnungsperiode existiert aber ein eindeutiger, umgekehrt proportionaler Zusammenhang (Abb. 4.21). Das bedeutet, dass eine Regulation sowohl nach dem absoluten CO_2 -Partialdruck als auch nach der P_{CO_2} -Differenz bei Insektenpuppen unwahrscheinlich ist.

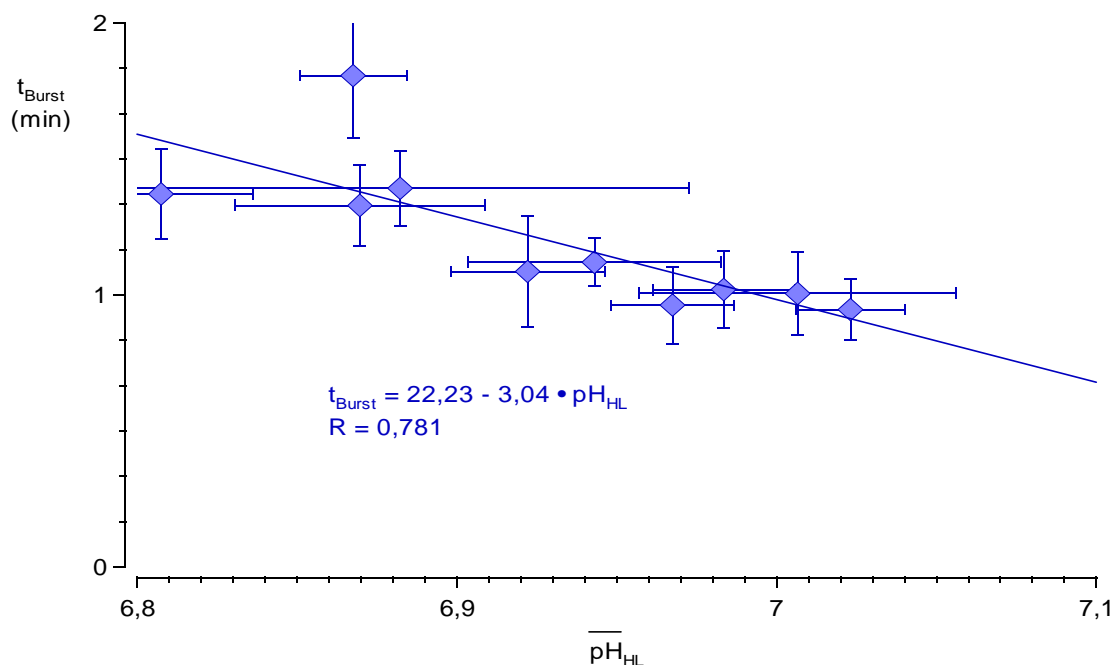


Abbildung 4.21 Zusammenhang zwischen mittlerem pH-Wert der Hämolymphe und Dauer der Öffnungsperioden bei Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen (N = 10). Die Dauer der Öffnungsperioden nimmt mit steigendem pH-Wert ab.

Ausgehend vom Modell des P_{CO_2} -Sensors wurde ein mathematisches Modell konstruiert, das bei definierter CO_2 -Menge im Burst und konstanter CO_2 -Partialdruckdifferenz im Gewebe die Parameter des Säure-Basen-Status in Hämolymphe und Gewebe vor und nach der Öffnungsperiode berechnet. In Abb. 4.22 sind die Ergebnisse des Modells für eine P_{CO_2} -Differenz von 0,05 kPa im Gewebe und eine Stoffmenge von 100 nmol CO_2 im Burst dargestellt.

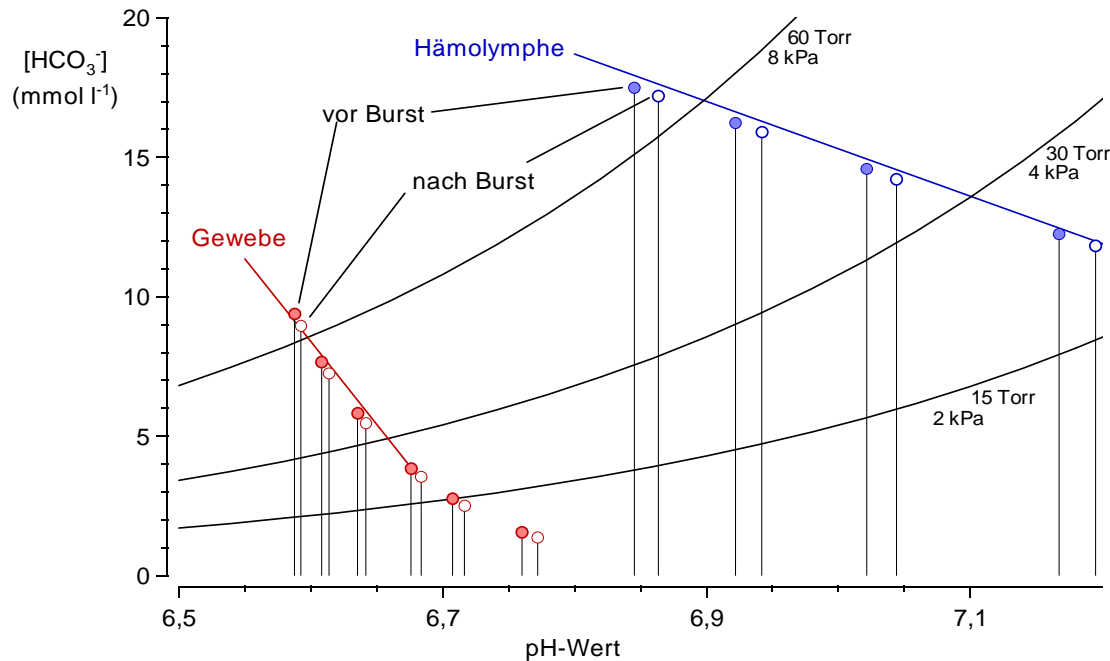


Abbildung 4.22 Theoretische Berechnung der Parameter des Säure-Basen-Status vor (gefüllte Symbole) und nach (offene Symbole) der Öffnungsperiode bei Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Ausgangspunkt war ein Burst mit 100 nmol CO_2 und ein konstanter Partialdruckunterschied von 0,05 kPa im Gewebe. Die Bikarbonatkonzentration und der pH-Wert der Kompartimente wurden für verschiedene CO_2 -Partialdrucke vor der Öffnungsperiode berechnet. Je niedriger der CO_2 -Partialdruck und je höher der pH-Wert, desto geringer die pH-Wert-Differenz und desto höher die Bikarbonatkonzentrationsdifferenz zwischen Beginn und Ende der Öffnungsperiode.

Je niedriger der CO_2 -Partialdruck, desto größer sind die Änderungen des pH-Werts für eine gegebene P_{CO_2} -Differenz. Dieser Zusammenhang ergibt sich unmittelbar aus Gleichung 13 auf Seite 47. Der Quotient von P_{CO_2} nach und P_{CO_2} vor der Öffnungsperiode wird größer, je niedriger der CO_2 -Partialdruck vor der Öffnungsperiode ist. Daraus resultiert eine größere pH-Differenz, gleichzeitig sinkt die Änderung der Bikarbonatkonzentration. Dieser Zusammenhang zeigt sich durch ein Absinken des Pufferwerts und ein Abflachen der Pufferfunktion in Abb. 4.22 bei sinkendem CO_2 -Partialdruck.

Von Atemregulationen anderer Organismen ist bekannt, dass die eigentlich gemessene und regulierte Größe eine Veränderung des pH-Werts im kontrollierenden Kompartiment ist. Diese Art der Kontrolle hat den Vorteil, dass die Regelgröße von Absolutwerten unabhängig ist. Würde man ein solches Regelsystem für die Puppen von *Zophobas* annehmen, dann sollte die pH-Änderung des untersuchten Kompartiments konstant bleiben, unabhängig vom herrschenden CO_2 -Partialdruck und vom herrschenden pH-Wert. Tatsächlich ist die gemessene pH-Änderung unabhängig vom pH-Wert der Hämolymphe und wegen des Zusammenhangs über die HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung unabhängig vom absoluten Kohlendioxidpartialdruck. Da der apparente Pufferwert der Kompartimente mit fallendem P_{CO_2} sinkt (Abb. 4.22), wird die pH-Wert-Differenz bei gleicher Stoffwechselrate in kürzerer Zeit erreicht. Als unmittelbare Folge verkürzen sich sowohl Öffnungsperiode, als auch Interburstperiode. Die Zyklusdauer sinkt.

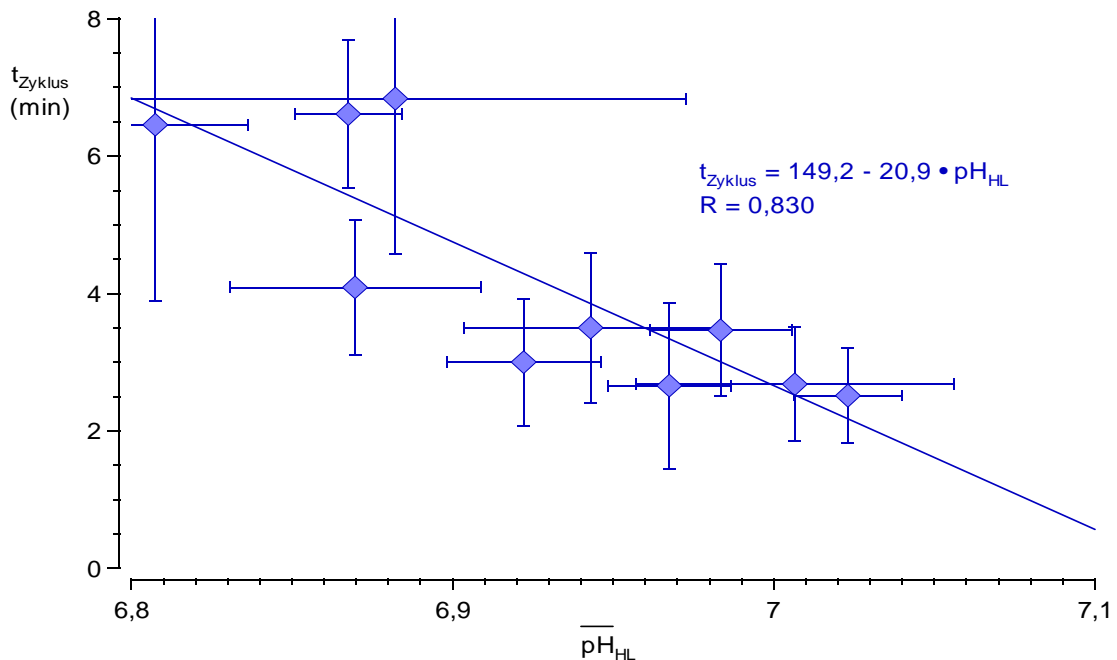


Abbildung 4.23 Zusammenhang zwischen mittlerem pH-Wert der Hämolymphe und Zyklusdauer bei Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes*. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen (N = 10). Die Zyklusdauer sinkt mit steigendem pH-Wert. Dieser Zusammenhang spricht für eine Regulation der CO₂-Abgabe nach pH-Wert-Differenzen.

In Abb. 4.21 und Abb. 4.23 zeigt sich, dass Zyklusdauer und Öffnungsperiode kürzer sind, wenn der pH-Wert der Hämolymphe hoch ist. Puppen von *Zophobas rugipes* regulieren die CO₂-Abgabe durch die Messung von pH-Wert-Änderungen.

4.10 Zusammenfassung der Untersuchungen *in vivo*

Die Puppen des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* erhöhen auf Grund der Verletzung durch die Elektrodenimplantation den Stoffwechsel. Dies führt zu einer Veränderung oder Aufgabe der zyklischen, diskontinuierlichen Kohlendioxidabgabe. Durch eine immunspezifische oder Hypoxie bedingte Ansäuerung der Hämolymphe wird eine metabolische Azidose ausgelöst, die durch Reaktion der Protonen mit Bikarbonat und Abatmen von Kohlendioxid respiratorisch kompensiert wird. Trotz dieser als pathologisch zu bezeichnenden Veränderungen im Säure-Basen-Status sind die Puppen in der Lage, hyperkapnische Zustände bis hin zur völligen Anoxie in reiner CO₂-Atmosphäre über längere Zeit zu tolerieren und teilweise zu kompensieren. Der Zusammenhang zwischen Zykluszeit, Dauer der Öffnungsperiode und gemessenem pH-Wert deutet auf eine Atemregulation nach Differenzen im pH-Wert hin. Das Leben im Guano von Fledermäusen kann durch geringen Sauerstoff- und hohen Kohlendioxidgehalt geprägt sein. Da die bewegungsunfähigen Puppen diese ungünstigen Lebensbedingungen tolerieren müssen, sichern sie ihr Überleben durch physiologische Kompensationsmechanismen.

Anhang

1. Literaturverzeichnis

- [L1] Acierno, R., Maffia, M., Rollo, M., Storelli, C. (1997): Buffer Capacity in the Blood of the Hemoglobinless Antarctic Fish *Chionodraco hamatus*. Comp. Biochem. Physiol. A 118, 4, 989-992
- [L2] Agrell, I. (1949): Occurrence and Metabolism of Free Amino Acids during Insect Metamorphosis. Acta Physiol. Scand. 18, 247-258
- [L3] Agrell, I., Lundquist, A.M. (1973): Physiological and biochemical changes during insect development. In: Rockstein, The Physiology of Insecta, Vol. 1, 159-247
- [L4] Albers, C., Goetz, K.G. (1985): H⁺ and Cl⁻ ion equilibrium across the red cell membrane in the carp. Resp. Physiol. 61, 201-219
- [L5] Altmann, P.L., Dittmer, D.S. (1974): Biology Data Book, Volume III. 2. Ausgabe, Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, USA
- [L6] Anwyl, R., Usherwood, P.N.R. (1974): Voltage-clamp studies of the glutamat response at the insect neuromuscular junction. J. Physiol. 242, 86P-87P
- [L7] Auerswald, L., Schneider, P., Gäde, G. (1998): Proline powers pre-flight warm-up in the African Fruit Beetle *Pachnoda sinuata* (Cetoniidae). J. Exp. Biol. 201, 1651-1657
- [L8] Bänziger, E., Vasey, C. (1996): Abnehmen mit dem Säure-Basen-Gleichgewicht. 1. Auflage, Midena-Verlag, Augsburg
- [L9] Barsa, M.C. (1954): The behaviour of isolated hearts of the grasshopper, *Chortophaga viridifasciata* and the moth, *Samia walkeri* in solutions with different concentrations of sodium, potassium, calcium, and magnesium. J. Gen. Physiol. 38, 79-92
- [L10] Beckel, W.E., Schneiderman, H.A. (1957): The insect spiracle as an independent effector. Science, 126, 559-560
- [L11] Belton, P. (1958): Membrane potentials recorded from moth muscle fibers. Proc. Physiol. Soc. March, 20-21
- [L12] Belton, H., Grundfest, H. (1962): Potassium activation and K-spikes in muscle fibers of the mealworm larva (*Tenebrio molitor*). Am. J. Physiol. 203, 588-594
- [L13] Bishop, G.H. (1923): Body fluid of the honey bee larva. I. Osmotic pressure, specific gravity, pH, O₂ capacity, CO₂ capacity and buffer value, and their changes with larval activity and metamorphosis. J. Biol. Chem. 58, 543-565
- [L14] Boche, R.D., Buck, J.B. (1942): Studies on the hydrogen-ion concentration of insect blood and their bearing on *in vitro* cytological technique. Physiol. Zool. 15, 3, 293-303
- [L15] Bodine, J.H. (1925): Hydrogen ion concentration in the blood of certain insects (Orthoptera). Biol. Bull. 51, 363-369
- [L16] Bodnaryk, R.P. (1981): The biosynthesis, function and fate of taurine during the metamorphosis of the noctuid moth *Mamestra configurata* Wlk. Insect Biochem. 11, 199-205

- [L17] Boné, G.J. (1944). Le rapport sodium / potassium dans le liquide coelomique des insectes. 1. Ses relations avec le régime alimentaire. Ann. Soc. Roy. Zool. Belg 75, 123-132
- [L18] Bridges, C.R., Scheid, P. (1982): Buffering and CO₂ dissociation of body fluids in the pupa of the silkworm moth, *Hyalophora cecropia*. Resp. Physiol. 48, 183-197
- [L19] Buck, J.B. (1958): Cyclic CO₂ release in insects. - IV. A theory of mechanism. Biol. Bull. 114, 118-140
- [L20] Buck, J.B., Keister, M. (1955): Cyclic CO₂ release in diapausing *Agapema* pupae. Biol. Bull. 109, 1, 144-163
- [L21] Buck, J.B., Keister, M. (1958): Cyclic CO₂ release in diapausing pupae - II. Tracheal anatomy, volume and P_{CO_2} blood volume interburst CO₂ release rate. J. Insect Physiol. 1, 327-340
- [L22] Buck, J.B., Friedman, S. (1958): Cyclic CO₂ Release in Diapausing Pupae - III CO₂ Capacity of the Blood: Carbonic Anhydrase. J. Insect Physiol. 2, 52-60
- [L23] Buck, J.B., Keister, M., Specht, H. (1953): Discontinuous respiration in diapausing *Agapema* pupae. Anat. Rec. Am. Soc. Zool. 117, 541
- [L24] Buxton P. (1930): Evaporation from the meal-worm (*Tenebrio*: Coleoptera) and atmospheric humidity. Proc. Roy. Soc. London Ser. B 106, 560-577
- [L25] Buxton P. (1932): Terrestrial insects and the humidity of their environment. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 7, 275-320
- [L26] Carrington, C.B., Tenney, S.M. (1959): Chemical constituents of haemolymph and tissue in *Telea polyphemus* Cram. with particular reference to the question of ion binding. J. Insect Physiol. 3, 402-413
- [L27] Case, J.F. (1961): Effects of acids on an isolated insect respiratory center & Organization of the cockroach respiratory center. Biol. Bull. 121, 385
- [L28] Chang, J.Y., Knecht, R., Braun, D.G. (1983): Amino Acid Analysis in the Picomole Range by Precolumn Derivatization and High-Performance Liquid Chromatography. Meth. Enzymol. 91, 41-48
- [L29] Chen, P.S. (1966): Amino Acid and Protein Metabolism in Insect Development. In: Beament, J.W.L.; Treherne, J.E.; Wigglesworth, V.B. Advances in Insect Physiology. Vol. 3, 53-132, 1. Auflage, Academic Press London
- [L30] Chen, P.S., Levenbook, L. (1966): Studies on the Haemolymph Proteins of the Blowfly *Phormia regina* - I. Changes in ontogenetic Patterns. J. Insect Phys. 12, 1595-1609
- [L31] Cho, Y., Choi, H.W., Moon, G.Y., Kim, M.H., Kwon, T.H., Homma, K., Natori, S., Lee, B.L. (1999): An 86 kDa diapause protein 1-like protein is a component of early-staged encapsulation-relating proteins in coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae. FEBS Letters 451, 303-307
- [L32] Chown, S.L. (2001): Physiological variation in insects: hierarchical levels and implications. J. Insect Physiol. 47, 649-660
- [L33] Christiansen, J., Douglas, C.G., Haldane, J.S. (1914): The absorption and dissociation of carbon dioxide by human blood. J. Physiol. 48, 244-271

-
- [L34] Cooper, T.G. (1981): Biochemische Arbeitsmethoden. 1. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin
 - [L35] Clark, E.W., Craig, R. (1953): The calcium and magnesium content in the hemolymph of certain insects. *Physiol. Zool.* 26, 101-107
 - [L36] Coutchié, P.A., Crowe, J.H. (1979): Transport of water vapor by tenebrionid beetles. II. Regulation of the osmolarity and composition of the hemolymph. *Physiol. Zool.* 52, 88-100
 - [L37] Crailsheim, K., Leonhard, B. (1997): Amino acids in honeybee worker haemolymph. *Amino Acids* 13, 2, 141-153
 - [L38] Davenport, H.W. (1974): The ABC of Acid-Base Chemistry. 6. Auflage, University of Chicago Press, Chicago, London
 - [L39] Dejours, P. (1981): Principles of Comparative Respiratory Physiology, 2. Ausgabe, Elsevier Science Publishers, Amsterdam
 - [L40] Delmotte, C., Delmas, A. (1999): Synthesis and fluorescence properties of Oregon Green[®] 514 labeled peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 2989-2994
 - [L41] Demjanowski, S., Galzowa, R., Roshdestwenska, W. (1932): Wahre Azidität der Hämolymphe von *Bombyx mori* L. I. Mitteilung: Zur Kenntnis des Stoffwechsels der Seidenraupen. *Biochem. Z.* 247, 386-405
 - [L42] Djamgoz, M.B. (1987): Insect muscle: intracellular ion concentrations and mechanisms of resting potential generation. *J. Insect Physiol.* 33, 287-314
 - [L43] Duchâteau, G., Florkin, M., Leclercq, J. (1953): Concentration des bases fixes et types de composition de la base totale de l'hémolymphe des insectes. *Arch. Int. Physiol.* 61, 4, 518-549
 - [L44] Duchâteau, G., Florkin, M. (1958): A survey of aminoacidemias with special reference to the high concentration of free aminoacids in insect hemolymph. *Arch. Int. Phys. Biochim.* 66, 4, 573-591
 - [L45] Duchâteau-Bosson, G., Jeuniaux, C., Florkin, M. (1962): Contribution a la biochimie du ver a soie XXV. - Variations de la concentration de la tyrosine de l'hémolymphe au cours du développement de *Bombyx mori* L. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 70, 2, 287-291
 - [L46] Duncan, F.D., Lighton, J.R.B. (1997): Discontinuous ventilation and energetics of locomotion on the desert-dwelling female mutillid wasp, *Dasymutilla gloriosa*. *Physiol. Entomol.* 22, 310-315
 - [L47] Duval, M., Portier, P. (1928): La teneur en phosphore minéral du sang de quelques invertébrés. *Comp. Rend. Soc. Biol.* 99, 1831-1832
 - [L48] Duval, M., Portier, P., Courtois, A. (1928): Sur la présence de grandes quantités d'acides amines dans le sang des Insectes. *Comp. Rend. Acad. Sci.* 186, 625-653
 - [L49] Edney, E.B. (1971): Some aspects of water balance in tenebrionid beetles and a thysanuran from the Namib Desert of South Africa. *Physiol. Zool.* 44, 6-76
 - [L50] Edney, E.B. (1977): Water Balance in Land Arthropods. 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin

- [L51] Farber, S.J., Schubert, M. (1957): The binding of cations by chondroitin sulfate. J. Clin. Inv. 36, 1715-1722
- [L52] Ferrance, J.P., Goel, A., Alaa, M.M. (1993): Utilization of Glucose and Amino Acids in Insect Cell Cultures: Quantifying the Metabolic Flows within the Primary Pathways and Medium Development. Biotech. Bioeng. 42, 6, 697-707
- [L53] Florkin, M. (1936): Nouvelles données sur la teneur en protéines du plasma sanguin des Insectes. Compt. Rend. Soc. Belg. Biol. Paris, 123, 1024-1026
- [L54] Florkin, M., Jeuniaux, C. (1974): Hemolymph: Composition.
In: Rockstein, M., The Physiology of Insecta, Vol. 2, Academic Press, New York
- [L55] Fraenkel, G. (1932): Untersuchungen über die Koordination von Reflexen und automatisch-nervösen Rhythmen bei Insekten. IV. Über die nervösen Zentren der Atmung und die Koordination ihrer Tätigkeit. Z. vergl. Physiol. 16, 444-462
- [L56] Francois, J. (1985): Biochemical and biophysical characterization of the collagen from an insect, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae). Biochimie 67, 285-295
- [L57] Gäde, G. (1991): Hyperglycaemia or hypertrehalosaemia? The effect of insect neuropeptides on haemolymph sugars. J. Insect Physiol. 37, 7, 483-487
- [L58] Gehrken, U., Sømme, L. (1994): Tolerance of desiccation in beetles from the High Atlas Mountains. Comp. Biochem. Physiol. A 109, 4, 913-922
- [L59] Gekko, K., Ohmae, E., Kameyama, K., Takagi, T. (1998): Acetonitrile-protein interactions: amino acid solubility and preferential solvation. Biochim. Biophys. Acta 1387, 195-205
- [L60] Gewecke, M. (1995): Physiologie der Insekten. 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York
- [L61] Gierth, S. (1999): Stoffwechsel und Ionenregulation während der pupalen Entwicklung des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* (Coleoptera, Tenebrionidae). Diplomarbeit, Institut für Biologie, Humboldt Universität zu Berlin
- [L62] Gierth, S., Kaiser, A., Hetz, S.K., Heisler, N. (1999): Respiratory and metabolic characteristics during pupal development in the mealworm *Zophobas rugipes*. Zoology 102, 63
- [L63] Giordana, B., Parenti, P. (1994): Determinants for the activity of the neutral amino acid/K⁺ symport in lepidopteran larval midgut. J. Exp. Biol. 196, 145-155
- [L64] Glaser, R.W. (1925): Hydrogen ion concentrations in the blood of insects. J. Gen. Physiol. 7, 599-602
- [L65] Greenlee, K.J., Harrison, J.F. (1998): Acid-base and respiratory response to hypoxia in the grasshopper *Schistocerca americana*. J. Exp. Biol. 201, 2843-2855
- [L66] Hagiwara, S. (1953): Neuro-muscular transmission in insects. Jap. J. Physiol. 3, 284-296
- [L67] Harak, M., Kuusik, A., Hiisaar, K., Metspalu, L., Luik, A., Tartes, U. (1998): Calorimetric investigations on physiological stress in *Tenebrio molitor* (Coleoptera, tenebrionidae) pupae. Thermochim. Acta 309, 1-2, 57-61

-
- [L68] Harrison, J.F. (1988): Temperature effects on haemolymph acid-base status *in vivo* and *in vitro* in the two-striped grasshopper *Melanoplus bivittatus*. J. Exp. Biol. 140, 421-435
- [L69] Harrison, J.F. (1989): Ventilatory frequency and haemolymph acid-base status during short-term hypercapnia in the locust, *Schistocerca nitens*. J. Insect Physiol. 35, 11, 809-814
- [L70] Harrison, J.F. (1989): Temperature effects on intra- and extracellular acid-base status in the American locust, *Schistocerca nitens*. J. Comp. Physiol. B 158, 763-770
- [L71] Harrison, J.F., Wong, C.J.H., Philipps, J.E. (1990): Haemolymph buffering in the locust *Schistocerca gregaria*. J. Exp. Biol. 154, 573-579
- [L72] Harrison, J.F., Wong, C.J.H., Philipps, J.E. (1992): Recovery from acute haemolymph acidosis in unfed locusts. 1. Acid transfer from the alimentary lumen is the dominant mechanism. J. Exp. Biol. 165, 85-96
- [L73] Harrison, J.F., Hadley, N.F., Quinlan, M.C. (1995): Acid-base-status and spiracular control during discontinuous ventilation in grasshoppers. J. Exp. Biol. 198, 1755-1763
- [L74] Hazelhoff, E.H. (1927): Die Regulierung der Atmung bei Insekten und Spinnen (Übersetzung von H. Jordan). Z. vergl. Physiol. 5, 179-190.
- [L75] Heisler, N. (1975): Intracellular pH of isolated rat diaphragm muscle with metabolic and respiratory changes of extracellular pH. Resp. Physiol. 23, 243-255
- [L76] Heisler, N. (1986): Acid-Base Regulation in Animals, 1. Ausgabe, Elsevier Science Publishers, Amsterdam
- [L77] Heisler, N. (1989): Interactions between gas exchange, metabolism, and ion transport in animals: an overview. Can. J. Zool. 67, 2923-2935
- [L78] Heisler, N., Piper, J. (1972): Determination of intracellular buffering properties in rat diaphragm muscle. Am. J. Physiol. 222, 3, 747-753
- [L79] Heisler, N., Weitz, H., Weitz, A.M. (1976): Hypercapnia and resultant bicarbonate transfer processes in an elasmobranch fish. Bull. Eur. Physiolopathol. Respir. 12, 77-85
- [L80] Heller, J., Moklowska, A. (1930): Über die Zusammensetzung des Raupenblutes bei *Deilephila euphorbiae* und deren Veränderungen im Verlauf der Metamorphose. Biochem. Zeitschr. 219, 473-489
- [L81] Hetz, S.K. (1990): Simultane kontinuierliche Messung von Herzschlagaktivitäten, Kohlendioxidausstoß und pH-Änderungen in der Hämolymphe an lebenden Tagfalterpuppen. Diplomarbeit, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
- [L82] Hetz, S.K. (1994): Untersuchungen zu Atmung, Kreislauf und Säure-Basen-Regulation an Puppen der tropischen Schmetterlingsgattungen *Ornithoptera*, *Troides* und *Attacus*. Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
- [L83] Hetz, S.K., Kaden, H., Oelssner, W. (1995): Elektrochemische pH und P_{CO_2} -Messung in diapausierenden Schmetterlingspuppen - Analogien zwischen Sensorprinzip und Steuerung des Säure-Basen-Haushaltes. 2. Dresdner Sensor-Symposium
- [L84] Hochrainer, H. (1942): Der Wasserhaushalt bei Insekten und die Faktoren, die denselben bestimmen. Zool. Jahrb. Allg. Zool. Physiol. 60, 387-436

- [L85] Holleman, A.F., Wiberg, N. (1985): Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 91.-100. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin
- [L86] Holter, P. (1994): Tolerance of dung insects to low oxygen and high carbon dioxide concentrations. *Eur. J. Soil Biol.* 30, 187-193
- [L87] Hoyle, G. (1953): Potassium ions and insect nerve muscle. *J. Exp. Biol.* 30, 121-135
- [L88] Hoyle, G. (1956): Sodium and Potassium Changes occurring in the Haemolymph of Insects at the Time of Moulting and their Physiological Consequences. *Nature* 178, 1236-1237
- [L89] Hoyle, G. (1957): Nervous control of insect muscles.
In: Scheer, B.T., Bullock, T.H., Kleinholz, L.H., Martin, A.W., Recent Advances in Invertebrate Physiology, University of Oregon Publications, 1, 73-98
- [L90] Hoyle, G. (1959): The neuromuscular mechanism of an insect spiracular muscle. *J. Insect Physiol.* 3, 373-394
- [L91] Hoyle, G. (1960): The action of carbon dioxide gas on an insect spiracular muscle. *J. Insect Physiol.* 4, 63-79
- [L92] Hudson (1966): Proteins in the haemolymph and other tissues of the developing Tomato Hornworm, *Protoparce quinquemaculata* Haworth. *Can. J. Zool.* 44 541-555
- [L93] Irving, L., Foster, H.C., Ferguson, J.K.W. (1932): The carbon dioxide dissociation curve of living mammalian muscle. *J. Biol. Chem.* 95, 95-113
- [L94] Jeuniaux, C. (1971): Hemolymph-Arthropoda. In: Florkin, M., Scheer, B.T.: Chemical Zoology, Arthropoda, Part B, Vol 6, 63-118, Academic Press, New York
- [L95] Kaiser, A., Wasserthal, L.T., Hetz, S.K., Heisler, N. (1996): Spiracular movement of butterfly pupae - modulation of amplitude or of frequency. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 89, 1, 155
- [L96] Kaiser, A., Heisler, N., Hetz, S.K. (1997): The influence of hypercapnia on the acid-base-status of diapausing moth pupae (*Attacus atlas*). *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 90, 110
- [L97] Kaiser, A., Heisler, N., Hetz, S.K. (1997): Discontinuous CO₂ release: can diapausing moth pupae compensate hypercapnia? *Int. Conf. Comp. Physiol. Biochem.*, Skukuza, Krüger National Park, Südafrika, 52
- [L98] Kaiser, A., Hetz, S.K. (1998): The role of the hemolymph in discontinuous CO₂ release of diapausing moth pupae - hypercapnia, hypocapnia and compensation. *VIth Europ. Congr. Entomol.*, Budejovice, Tschechische Republik
- [L99] Kießling, G. (1997): Zusammensetzung und Physiologie der Hämolymphe von Lepidopteren. Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
- [L100] Kleber, H.F., Schlee, D., Schöpp, W. (1997): Biochemisches Praktikum. 5. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- [L101] Klotz, I.M. (1949): The nature of some ion-protein complexes. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 14, 97-116
- [L102] Kocian, V., Špacek, M. (1934): Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration der Körperflüssigkeit von Coleopteren. *Zool. Jahrb. Physiol.* 54, 180-190

-
- [L103] Konok, I. (1955): The suitability of the mealworm *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera) for physiological experiments. Ann. Inst. Biol. Tihaney 23, 29-36
 - [L104] Krogh, A. (1914): On the rate of development and CO₂ production of chrysalids of *Tenebrio molitor* at different temperatures. Z. allg. Physiol., 178-190
 - [L105] Krogh, A. (1920): Studien über Tracheenrespiration. II. Über Gasdiffusion in den Tracheen. Pflügers Archiv 179, 95-112
 - [L106] Lane, N.J. (1972): Fine Structure of a Lepidopteran Nervous System and Its Accessibility to Peroxidase and Lanthanum. Z. Zellforsch. 131, 205-222
 - [L107] Le Corrionc, H., Hue, B., Pitman, R.M. (1999): Ionic Mechanisms Underlying Depolarizing Responses of an Identified Insect Motor Neuron to Short Periods of Hypoxia. J. Neurophys. 81, 1, 307-318
 - [L108] Le Lagadec, M.D., Chown, S.L., Scholtz, C.H. (1998): Desiccation resistance and water balance in southern African keratin beetles (Coleoptera, Trogidae): The influence of body size and habitat. J. Comp. Physiol. B 168, 112-122
 - [L109] Lee, R.M. (1961): The variation of blood volume with age in the Desert Locust (*Schistocerca gregaria* Forsk.). J. Insect Physiol. 6, 36-51
 - [L110] Leonhard, B., Crailsheim, K. (1999): Amino acids and osmolarity in honeybee drone haemolymph. Amino Acids 17, 195-205
 - [L111] Levenbook, L. (1950): The composition of Horse Bot Fly (*Gastrophilus intestinalis*) larva blood. Biochem. J. 47, 336-346
 - [L112] Levenbook, L. (1950): The physiology of carbon dioxide transport in insect blood. I. The form of carbon dioxide present in *Gastrophilus* larva blood. J. Exp. Biol. 27, 158-174
 - [L113] Levenbook, L. (1950): The physiology of carbon dioxide transport in insect blood. III. The buffer capacity of *Gastrophilus* blood. J. Exp. Biol. 27, 184-191
 - [L114] Levenbook, L. (1958): Intracellular water of larval tissues of the Southern Armyworm as determined by the use of C¹⁴-Carboxyl-Inulin. J. Cell. Comp. Physiol. 52, 329-339
 - [L115] Levy, R.I., Schneiderman, H.A. (1958): An experimental solution to the paradox of discontinuous respiration in insects. Nature 23, 491-493
 - [L116] Levy, R.I., Schneiderman, H.A. (1966): Discontinuous respiration in insects II. The direct measurement and significance of changes in tracheal gas composition during the respiratory cycle of silkworm pupae. J. Insect Physiol. 12, 83-104
 - [L117] Levy, R.I., Schneiderman, H.A. (1966): Discontinuous respiration in insects III. The effect of temperature and ambient oxygen tension on the gaseous composition of the tracheal system of silkworm pupae. J. Insect Physiol. 12, 105-121
 - [L118] Levy, R.I., Schneiderman, H.A. (1966): Discontinuous respiration in insects IV. Changes in intratracheal pressures during the respiratory cycle of silkworm pupae. J. Insect Physiol. 12, 465-492
 - [L119] Ling, G., Gerard, R.W. (1949): The normal membrane potential of frog sartorius fibers. J. Cell. Comp. Physiol. 34, 383-396

- [L120] Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998): Bioanalytik. 1. Auflage
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- [L121] Loughton, B.G., Tobe, S.S. (1969): Blood Volume in the African Migratory Locust.
Can. J. Zool. 47, 1333-1336
- [L122] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement
with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- [L123] Maluf, N.S.R. (1939): The blood of arthropods. Quarterly Rev. Biol. 14, 149-191
- [L124] Marcuzzi, G. (1960): Il bilancio idrico nei coleotteri tenebrionidi.
Arch. Zool. Ital. 45, 281-324
- [L125] Mitlin, N., Wiygul, G., Mauldin, J.K. (1968): The free amino acids in the haemolymph
of the maturing adult Boll Weevil *Anthonomus grandis* Boheman.
Comp. Biochem. Physiol. 25, 139-148
- [L126] Molecular Probes (1999): Oregon Green[®] 488 Protein Labeling Kit (O-10241) Product
Information Sheet. <http://www.probes.com/media/pis/mp01800.pdf>
- [L127] Molecular Probes (2001): Dextran Conjugates Product Information Sheet.
<http://www.probes.com/media/pis/mp10241.pdf>
- [L128] Mullins, D.E. (1985): Chemistry and Physiology of the Hemolymph.
In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I.: Comprehensive Insect Physiology, Vol. 3, 1. Auflage,
Pergamon Press, Oxford
- [L129] Munson, S.C., Yeager, J.F. (1945): Concentration-Survival Time Relationship for
Roaches Injected with Arsenicals. J. Econ. Entomol. 38, 6. 634-642
- [L130] Nicolson, S.W. (1980); Water balance and osmoregulation in *Onymacris plana*, a
tenebrionid beetle from the namib desert. J. Insect Physiol. 26, 315-320
- [L131] Partridge, J., Moore, B.D., Halling, P.J. (1999): α -Chymotrypsin stability in aqueous-
acetonitrile mixtures: is the native enzyme thermodynamically or kinetically stable
under low water conditions? J. Mol. Cat. B: Enz. 6, 11-20
- [L132] Pastor, A., Alcácer, E., Forcada, C., Garcerá, M.D., Martínez, R. (1997):
Determination of organic and inorganic anions in insect haemolymph and midgut
contents by ion chromatography. J. Chromatogr. A 789, 1, 279-285
- [L133] Patrick, M.L., Bradley, T.J. (2000): The physiology of salinity tolerance in larvae of
two species of *Culex* mosquitoes: The role of compatible solutes.
J. Exp. Biol. 203, 4, 821-830
- [L134] Patrick, M.L., Bradley, T.J. (2000): Regulation of compatible solute accumulation in
larvae of the mosquito *Culex tarsalis*: Osmolarity *versus* salinity.
J. Exp. Biol. 203, 831-839
- [L135] Patterson, D.S.P. (1957): Qualitative and Quantitative Changes Observed in the Free
 α -Amino Nitrogen Fraction of *Tenebrio molitor* Pupal Tissues during Metamorphosis.
Biochem. J. 65, 729-735
- [L136] Paul, R.J., Pfeffer-Seidl, A., Efinger, R., Pörtner, H.O., Storz, H. (1994): Gas transport
in the haemolymph of arachnids - 2. carbon dioxide transport and acid-base balance. J.
Exp. Biol. 188, 1, 47-63

- [L137] Peck, S.B., Ruiz-Baliú, A.E., Garcés González, G.F. (1998): The Cave-inhabiting Beetles of Cuba (Insecta: Coleoptera): Diversity, Distribution and Ecology. *J. Cave Karst Studies* 60, 3, 156-166
- [L138] Pichon, Y., Sattelle, D.B., Lane, N.J. (1972): Conduction processes in the nerve cord of the moth *Manduca sexta* in relation to its ultrastructure and haemolymph ionic composition. *J. Exp. Biol.* 56, 717-734
- [L139] Piek, T.; Nijo, K.D. (1979): Morphology and Electrochemistry of Insect Muscle Fibre Membrane. In: Beament, J.W.L., Treherne, J.E., Wigglesworth, V.B., *Advances in Insect Physiology*. Vol. 14, 185-249, 1. Ausgabe, Academic Press, New York
- [L140] Plantevin, G. (1967): Dosage de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} de l'hémolymph de *Galleria mellonella* L. par spectrophotométrie de flamme. *J. Insect Physiol.* 13, 1907-1920
- [L141] Portier, P., Duval, M. (1927): Concentration moléculaire et teneur en chlore du sang de quelques insectes. *Comp. Rend. Soc. Biol.* 97, 1605-1606
- [L142] Pörtner, H.O. (1989): The importance of metabolism in acid-base regulation and acid-base methodology. *Can. J. Zool.* 67, 3005-3017
- [L143] Pratt, J.J. (1950): A qualitative analysis of the free amino acids in insect blood. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 43, 573-579
- [L144] Punt, A. (1950) The respiration of insects. *Acta brev. Neerlandica* 1, 59-74
- [L145] Punt, A., Parser, W.J., Kuchlein, J. (1957): Oxygen uptake in insects with cyclic CO_2 release. *Biol. Bull.* 112, 108-117
- [L146] Quennedey, A., Aribi, N., Everaerts, C., Delbecq, J.P. (1995): Postembryonic development of *Zophobas atratus* Fab (Coleoptera: Tenebrionidae) under crowded or isolated conditions and effects of juvenile hormone analogue applications. *J. Insect Physiol.* 41, 143-152
- [L147] Ramlov (1999): Microclimate and variations in haemolymph composition in the freezing-tolerant New Zealand alpine weta *Hemideina maori* Hutton (Orthoptera: Stenopelmatidae). *J. Comp. Physiol. B* 169, 3, 224-235
- [L148] Reddy, K.D., Chaudhuri, A., Thangalevu, K. (1994): L-Thyroxine (T4) Elevates the Free Amino Acid Pool of Haemolymph Plasma of Tasar Silkworm, *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera: Saturniidae). *Hormone Metab. Res.* 26, 570-573
- [L149] Richardson, C.H., Burdette, R.C., Eagleson, C.W. (1931): The determination of the blood volume of insect larvae. *Annals Ent. Soc. Am.* 24, 503-507
- [L150] Riley, P.A. (1997): Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 11, 1235-1239
- [L151] Roeder, K.D. (1948): The effect of potassium and calcium on the nervous system of the cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 32, 327-338
- [L152] Rouschal, W. (1940): Osmotische Werte wirbelloser Landtiere und ihre ökologische Bedeutung. *Z. wiss. Zool.* 153, 196-218
- [L153] Sachs, L. (1992): *Angewandte Statistik*. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin

- [L154] Saito, H., Shimoda, M. (1997): Insecticyanin of *Agrius convolvuli*: Purification and characterization of the Biliverdin-binding protein from the larval hemolymph. Zool. Sci. 14, 777-783
- [L155] Salin, C., Vernon, P., Vannier, G. (1999): Effects of temperature and humidity on transpiration in adults of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) J. Insect Physiol. 45, 10, 907-914
- [L156] Schneiderman, H.A. (1953): The discontinuous release of carbon dioxide by diapausing pupal insects. Anat. Rec. Am. Soc. Zool. 117, 540
- [L157] Schneiderman, H.A. (1956): Spiracular control of discontinuous respiration in insects. Nature 23, 1169-1171
- [L158] Schneiderman, H.A. (1960): Discontinuous respiration in insects: Role of the spiracles. Biol. Bull. 119, 494-528
- [L159] Schneiderman, H.A., Williams, C.M. (1953): The physiology of insect diapause. VII. The respiratory metabolism of the cecropia silkworm during diapause and development. Biol. Bull. 105, 320-334
- [L160] Schneiderman, H.A., Williams, C.M. (1955): An experimental analysis of the discontinuous respiration of the cecropia silkworm. Biol. Bull. 109, 123-143
- [L161] Shaw, J., Stobart, R.H. (1963): Osmotic and Ionic Regulation in Insects. In: Beament, J.W.L.; Treherne, J.E.; Wigglesworth, V.B., Advances in Insect Physiology. Vol. 1, 1. Ausgabe, Academic Press, London, New York.
- [L162] Shimoda, M., Saito, H. (1997); Identification of an Arylphorin-type Storage Protein in the Sweet Potato Hornworm, *Agrius convolvuli*. Comp. Biochem. Physiol. B 118, 4, 943-948
- [L163] Stahn, I. (1928): Über die Atmungsregulation, besonders die Kohlensäureregulation bei *Dixippus morosus* und *Aeschna grandis*. Zool. Jb. allg. Zool. 46, 1-86
- [L164] Stephen, W.P., Steinhauer, A.L. (1957): Sexual and developmental differences in insect blood proteins. Physiol. Zool. 30, 114-120
- [L165] Stryer, L. (1994): Biochemie, 2. korr. Nachdruck der 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- [L166] Šustr, V., Šimek, M. (1996): Behavioural responses to and lethal effects of elevated carbon dioxide concentration in soil invertebrates. Eur. J. Soil Biol. 32, 3, 149-155
- [L167] Sutcliffe, D.W. (1962): The composition of hemolymph in aquatic insects. J. Exp. Biol. 39, 325-343
- [L168] Sutcliffe, D.W. (1963): The chemical composition of haemolymph in insects and some other arthropods, in relation to their phylogeny. Comp. Biochem. Physiol. 9, 121-135
- [L169] Taylor, I.R., Birnie, J.H., Mitchell, P.H., Solinger, J.L. (1934): Hydrogen ion activity changes in *Galleria mellonella* during metamorphosis, as determined by a glass electrode with microvessel. Physiol. Zool. VII, 4, 593-599
- [L170] Telfer, W.H., Williams, C. (1960): The effects of diapause, development, and injury of the incorporation of radioactive glycine into the blood proteins of the Cecropia silkworm. J. Ins. Physiol. 5, 61-72

-
- [L171] Tobias, J.M. (1948): The high potassium and low sodium in the body fluid and tissues of a phytophagous insect, the silkworm *Bombyx mori* and the change before pupation. J. Cell. Comp. Physiol. 31, 143-148
- [L172] Treviranus, G.R. (1816-1820): Vermischte Schriften anatomischen und physiologischen Inhalts. Göttingen
- [L173] Tschinkel, W.R., van Belle, G. (1976): Dispersal of Larvae of the Tenebrionid Beetle, *Zophobas rugipes*, in Relation to Weight and Crowding. Ecology 57, 1, 161-168
- [L174] Tschinkel, W.R., Willson, C.D. (1971): Inhibition of pupation due to crowding in some tenebrionid beetles. J. Exp. Zool. 176, 137-146
- [L175] Twarog, B.M., Roeder, K.D. (1956): Properties of the connective tissue sheath of the cockroach abdominal nerve cord. Biol. Bull. 111, 278-286
- [L176] Urich, K. (1990): Vergleichende Biochemie der Tiere, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- [L177] Usherwood, P.N.R. (1969): Electrochemistry of Insect Muscle. In: Beament, J.W.L., Treherne, J.E., Wigglesworth, V.B.: Advances in Insect Physiology, Vol. 6, Academic Press, London, New York
- [L178] Ussing, H.H. (1946): Amino Acids and Related Compounds in the Haemolymph of *Oryctes nasicornis* and *Melolontha vulgaris*. Acta Physiol. Scand. 11, 61-84
- [L179] Vendrell, J., Aviles, F.X. (1986): Complete amino acids analysis of proteins by Dabsyl derivatization and reversed-phase liquid chromatography. J. Chrom. 358, 401-413
- [L180] Vogt, J.T., Appel, A.G. (2000): Discontinuous gas exchange in the fire ant, *Solenopsis invicta* Buren: Caste differences and temperature effects. J. Insect Physiol. 46, 403-416
- [L181] Weast (1973): Handbook of Chemistry and Physics, 54. Ausgabe, CRC Press, Cleveland, Ohio, USA
- [L182] Weber, H., Weidner, H. (1974): Grundriß der Insektenkunde. 5. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- [L183] Weidler, D.J., Sieck, G.C. (1977): A study of ion binding in the hemolymph of *Periplaneta americana*. Comp. Biochem. Physiol. A 56, 11-14
- [L184] Welz, B., Sperling, M. (1999): Atomic Absorption Spectrometry. 3. Auflage, Wiley-Verlag, Weinheim
- [L185] Wipking, W., Viebahn, M., Neumann, D. (1995): Oxygen consumption, water, lipid and glycogen content of early and late diapause and non-diapause larvae of the Burnet moth *Zygaena trifolii*. J. Insect Physiol. 41, 47-56
- [L186] Wobschall, A. (2001): Untersuchungen zur Regulation der Stigmenaktivität an Puppen von *Zophobas rugipes* (Coleoptera, Tenebrionidae). Diplomarbeit, Humboldt Universität zu Berlin
- [L187] Woodring, J.P., Clifford, C.W., Roe, R.M., Beckman, B.R. (1978): Effects of CO₂ and anoxia on feeding, growth, metabolism, water balance, and blood composition in larval female house crickets, *Achaeta domestica*. J. Insect Physiol. 24, 499-509

- [L188] Wurbach, H., Siewing, R. (1985): Lehrbuch der Zoologie, Band 2 Systematik
3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- [L189] Wyatt, G.R., Kalf, G.F. (1957): The chemistry of insect hemolymph II. Trehalose and
other carbohydrates. J. Gen. Physiol. 40, 6
- [L190] Wyatt, G.R., Kropf, R.B., Carey, F.G. (1963): The chemistry of insect hemolymph IV.
Acid-soluble phosphates. J. Insect Physiol. 9, 137-152
- [L191] Wyatt, G.R., Loughheed, T.C., Wyatt, S.S. (1956): The chemistry of insect
hemolymph. Organic components of the hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*,
and two other species. J. gen. Physiol. 39, 6, 853-868
- [L192] Wyatt, G.R., Pan, M.L. (1978): Insect Plasma Proteins.
Ann. Rev. Biochem. 47, 779-817
- [L193] Yeager, J.F., Tauber, O.E. (1932): Determination of total blood volume in the
cockroach, *P. fuliginosa*, with special reference to method.
Ann. Entomol. Soc. Amer. 25, 315-327
- [L194] Yeager, J.F., Munson, S.C. (1950): Blood volume of the roach (*Periplaneta
americana*) determined by several methods. Arthropoda 1, 255-265

2. Geräte

- [G 1] Blutanalysegerät: Radiometer BMS MK2, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
- [G 2] Chloridtitrator: Digital Chloridometer, Haake Buchler Instruments Inc., Saddle Brook, USA
- [G 3] Dilutor: MicroLab 530B Spritzendilutor, Hamilton, Bonaduz, Schweiz
- [G 4] Diodenarrayphotometer: HP 8452, Hewlett Packard, Böblingen
- [G 5] Durchflussskühler: DLK 5, MGW Messgerätekwerk Lauda, Lauda-Königshofen
- [G 6] Flammenatomabsorptionsspektrometer: AA300 Perkin Elmer, Überlingen
- [G 7] Gasmischpumpe: DIGAMIX 2M303, Wösthoff KG, Bochum
- [G 8] Heizplatte: Ikamag RET, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen
- [G 9] HPLC: HP 1050, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen
- [G 10] HPLC-Trennsäule: Multosphere RP-18, 5 μm , 4 x 250 mm, APPLICA GmbH, Bremen
- [G 11] Kolbenhubpipette: eppendorf research, Eppendorf-Netteler-Hinz GmbH, Hamburg
- [G 12] Kühlzentrifuge: Sorvall RC 5C, Sorvall GmbH, Bad Homburg
- [G 13] Laminarflussabzug: Antares 72, STERIL S.p.A., Corsico (Milano), Italien
- [G 14] LaserScanMikroskop: LSM4, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
- [G 15] Luftkompressor: Modell AC0502-P1, Nitto Kohki Deutschland GmbH, Waldenbuch
- [G 16] Magnetventile: MA 232 (2-Weg), MA 302 (3-Weg), Steuerungstechnik Staiger GmbH & Co KG, Erligheim
- [G 17] Massendurchflussregler: 258C, MKS Instruments Deutschland GmbH, München
- [G 18] Mikrofeinwaage: 1201 MP2, Sartorius AG, Göttingen
- [G 19] Mikroliterspritzen: 1701, 1702, 1802, CR-700-20, Hamilton, Bonaduz, Schweiz
- [G 20] Mikromanipulator: Bachhofer, Reutlingen
- [G 21] Osmometer: Vapor Pressure Osmometer - model 5100C, Wescor Inc., Logan, USA
- [G 22] P_{CO_2} -Elektrode: Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
- [G 23] Peristaltikpumpe: Mini-S, Ismatec SA, Zürich, Schweiz
- [G 24] Thermostat: Thermostar S1, MGW Messgerätekwerk Lauda, Lauda-Königshofen
- [G 25] Tischkühlzentrifuge: Centrifuge 5417 R, Eppendorf-Netteler-Hinz GmbH, Hamburg
- [G 26] Trockenschrank: kelvitron t, Heraeus Instruments GmbH, Hanau
- [G 27] Ultrarotabsorptionsspektrometer: URAS 14, ABB Hartmann & Braun, Heiligenhaus
- [G 28] Vertikalpuller: 700C, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA
- [G 29] Vortexer: REAX 2000, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
- [G 30] Wasseraufbereitungssystem: MilliQ, Millipore GmbH, Eschborn

3. Materialien

- [M 1] AAS-Probengefäße: PS-autoanalyser cup, 1,5 ml, Greiner-Labortechnik GmbH, Frickenhausen
- [M 2] Ag/AgCl Pellet Elektrode: E 205 A, 1 x 2,5 mm, IVM, Science Products GmbH, Hofheim
- [M 3] Bleiglas kapillaren: 1400029, O.D. 1,9 mm, I.D. 1,0 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld
- [M 4] Borosilikatglas kapillaren: GC200-10 ohne Filament, O.D. 2,0 mm, I.D. 1,16 mm, Clark Electromedical Instruments, Reading, Großbritannien
- [M 5] Hämatokritmikrokapillaren: No. 6841-100, COMPUR Electronic GmbH, München
- [M 6] HPLC-Probengefäße: Screw Top Vials Rubber Septum, 2,0 ml, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
- [M 7] Insektenpräpariernadeln: Größe 00 und 000 mit Nylonkopf, Emil Arlt Spezialnadelfabrik, Premlechnergasse 28, A-1120 Wien, Österreich
- [M 8] Kryogefäße: Cryo.s, 2ml, Greiner-Labortechnik GmbH, Frickenhausen
- [M 9] pH-Glas-Kapillaren: pH100-15/20, O.D. 1,0 mm, Clark Electromedical Instruments, Reading, Großbritannien
- [M 10] Präzisionsmikropipette: 5µl ringcaps, 9600105, Hirschmann Laborgeräte
- [M 11] Reaktionsgefäße: eppendorf research, Eppendorf-Netteler-Hinz GmbH, Hamburg
- [M 12] Silikonabformmasse: silasoft S, DETAX GmbH, Ettlingen
- [M 13] Trockenperlen blau: Aluminosilikagel mit Farbindikator, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

4. Software

- [S 1] ActivePerl 5.6.1, ActiveState Corp., Vancouver, Canada
- [S 2] Adobe FrameMaker + SGML 5.5, Adobe System Incorporated, San Jose, CA, USA
- [S 3] CorelDraw 8, Corel Corp., Ottawa, Kanada
- [S 4] KyPlot 2.0 beta Versionen 11 - 15, Koichi Yoshioka, Japan
- [S 5] Microsoft Excel 98, Microsoft Corp., Redmond, USA
- [S 6] TURBOLAB, Stemmer, Puchheim

5. Chemikalien und Reagenzien

- [Ch 1] Agar Agar: 1613, hochrein, Merck KGaA, Darmstadt
- [Ch 2] Aceton: CHROMASOLV für HPLC,
Riedel de Haën Laborchemikalien GmbH & Co KG, Seelze
- [Ch 3] Acetonitril: 34854 CHROMASOLV gradient grade,
Riedel de Haën Laborchemikalien GmbH & Co KG, Seelze
- [Ch 4] Aminosäurestandard 1: AA-S-18 Amino Acid Standard Solution, 2,5 mmol L⁻¹,
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
- [Ch 5] Aminosäurestandard 2: STD Calibration Standard for Amino Acid Analysis,
2,5 mmol L⁻¹, Beckmann Instruments GmbH, München
- [Ch 6] Bovines Serum Albumin (BSA): A-2153, Fraktion V, Lot 59H0696,
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
- [Ch 7] Caesiumchlorid: Biomol Feinchemikalien GmbH, Ilvesheim
- [Ch 8] Citronensäure-1-Hydrat: 33114, Riedel de Haën Laborchem. GmbH & Co KG, Seelze
- [Ch 9] Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat: 22, 131-7,
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
- [Ch 10] Dimethylaminoazobenzensulfonylchlorid (DABS-Cl): D-7772, Lot 66H0076,
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
- [Ch 11] Dimethylformamid (DMF): 34903 Spectranal,
Riedel de Haën Laborchemikalien GmbH & Co KG, Seelze
- [Ch 12] Elektrodenreinigungslösung: Ingold GmbH & Co KG, Steinbach/Ts.
- [Ch 13] Fluoreszenzfarbstoff: D-7170, Oregon Green[®] 488, dextran, 10000 MW,
Molecular Probes Europe B.V., Leiden, Niederlande
- [Ch 14] Folin & Ciocalteu's Phenol-Reagenz: F-9252, Lot 118H5406,
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
- [Ch 15] Kaliumdihydrogenphosphat: 30407, für Analyse,
Riedel de Haën Laborchemikalien GmbH & Co KG, Seelze
- [Ch 16] Lanthantrioxid: AAS grade, 530430, LOT P1720, Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe
- [Ch 17] Lowry Reagenz: Lot 088H6044, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
- [Ch 18] di-Natriumhydrogenphosphat: 30427, für Analyse,
Riedel de Haën Laborchemikalien GmbH & Co KG, Seelze
- [Ch 19] Natriumbikarbonat: S 6297, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
- [Ch 20] Osmometerstandards: OA-100, OV-029, OV-010, Wescor Inc., Logan, USA
- [Ch 21] Präzisionspuffer: S1500 (pH 6,841 bei 37°C), Radiometer AS, Kopenhagen, Dänemark
- [Ch 22] Präzisionspuffer: S1510 (pH 7,383 bei 37°C), Radiometer AS, Kopenhagen, Dänemark
- [Ch 23] PTFE-Paste: Tripp PTFE-Gewindepaste, W. Tripp GmbH, Kirchheim
- [Ch 24] Titrisol-NaOH: 1 mol L⁻¹, 1.09956, Merck KGaA, Darmstadt

6. Tabellen

Im Tabellenteil des Anhangs sind alle Messwerte zusammengestellt, die die Grundlage der Ergebnisse bilden. Jede Tabelle enthält dabei das Alter der Versuchstiere in Tagen nach der Häutung zur Puppe und die prozentuale Entwicklungsdauer, die auch als Abszisseneinheit verwendet wurde. Diese Art der Einheit wurde gewählt, weil die Dauer des Puppenstadiums während der Versuche zwischen 9 und 11 Tagen variierte. N steht für die Anzahl der Versuchstiere, die für den Versuch verwendet wurden.

Alle untersuchten Parameter sind angegeben als Mittelwerte (MW) der einzelnen Entwicklungsstadien. In der folgenden Zeile finden sich die Standardabweichungen (S.A.) bzw. Standardfehler (S.F.) bei normalverteilten Ergebnissen oder minimale (min) und maximale (max) Grenzwerte durch Berechnung einer Fehlerfortpflanzung.

Alter (Tage)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Entwicklung (%)	8,3	16,6	24,9	33,2	41,5	49,8	58,1	66,4	74,7	83	91,3
N	7	7	7	7	7	6	7	7		7	6
Festbestand- teil (%)	41,01	41,91	40,85	41,34	41,27	41,33	41,33	41,74		41,13	41,39
S.A.	0,97	1,02	0,63	1,16	0,88	1,78	1,21	1,32		1,56	2,52
Wasser (%)	58,99	58,09	59,15	58,66	58,73	58,67	58,67	58,26		58,87	58,61
S.A.	0,97	1,02	0,63	1,16	0,88	1,78	1,21	1,32		1,56	2,52

Tabelle 6.1 Anteil von Wasser und Festbestandteilen bei Puppen von *Zophobas rugipes*.

Alter	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
N	8	7	5	5	4	5	5	5	5
Anteil Gewebe (%)	73,15	72,30	67,62	66,26	67,19	71,02	74,09	78,34	74,11
S.A.	7,36	3,74	4,65	6,88	7,57	5,72	5,68	2,40	3,45
Anteil Hämolymphe (%)	26,85	27,70	32,38	33,74	32,81	28,98	25,91	21,66	25,89
S.A.	7,36	3,74	4,65	6,88	7,57	5,72	5,68	2,40	3,45
Anteil Trockengewicht am Gewebe (%)	44,41	44,97	45,81	43,49	42,21	47,05	43,38	44,91	42,72
S.A.	1,38	1,56	1,97	2,09	2,44	4,58	2,04	1,60	1,18
Anteil Wassergewicht am Gewebe (%)	55,59	55,03	54,19	56,51	57,79	52,95	56,62	55,09	57,28
S.A.	1,38	1,56	1,97	2,09	2,44	4,58	2,04	1,60	1,18
Anteil Trockengewicht Gewebe am Gesamtgewicht (%)	32,49	32,52	30,98	28,81	28,36	33,42	32,14	35,18	31,66
S.A.	2,88	2,97	3,12	4,11	2,92	3,90	3,66	1,91	1,27
Anteil Wassergewicht Gewebe am Gesamtgewicht (%)	40,66	39,78	36,65	37,45	38,83	37,60	41,95	43,15	42,45
S.A.	4,72	4,74	2,05	3,02	5,23	4,57	2,31	1,50	2,52

Tabelle 6.2 Anteil des Gewebes und der Hämolymphe, sowie Anteil von Festbestandteilen und Wasser am Gewebe der Puppen von *Zophobas rugipes*.

Alter	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
N	6	6	4	8	8	7	4	4	5
Anteil Trockenge- wicht an Hämo- lymphe (%)	14,60	15,50	15,38	17,59	17,60	15,40	16,65	14,43	12,59
S.A.	1,08	1,42	1,80	0,70	2,19	2,93	2,66	0,78	1,39
Anteil Wasserge- wicht an Hämo- lymphe (%)	85,40	84,50	84,62	82,41	82,40	84,60	83,35	85,57	87,41
S.A.	1,08	1,42	1,80	0,70	2,19	2,93	2,66	0,78	1,39
Anteil Trockenge- wicht Hämo- lymphe am Gesamtgewicht (%)	3,92	4,29	4,98	5,94	5,78	4,46	4,31	3,13	3,26
S.A.	1,08	1,42	1,80	0,70	2,19	2,93	2,66	0,78	1,39
Anteil Wasserge- wicht Hämo- lymphe am Gesamtgewicht (%)	22,93	23,41	27,40	27,80	27,04	24,51	21,60	18,54	22,63
S.A.	1,08	1,42	1,80	0,70	2,19	2,93	2,66	0,78	1,39

Tabelle 6.3 Anteil von Wasser und Festbestandteilen an der Hämolymphe bei Puppen von *Zophobas rugipes*.

Alter	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
N	4	5	5	5	5	4	5	5	4
[K ⁺] (meq l ⁻¹)	22,9	25,4	20,4	29,2	22,5	19,8	25,5	31,9	20,3
S.A.	4,0	1,9	1,6	8,7	7,7	7,1	8,0	8,6	15,2
N	4	5	6	5	4	4	5	5	6
[Na ⁺] (meq l ⁻¹)	53,9	52,4	57,5	54,7	53,9	63,2	59,2	57,3	59,7
S.A.	1,6	4,4	3,4	4,1	1,1	9,2	8,1	7,0	2,3
N	5	5	5	4	5	5	4	5	4
[Ca ²⁺] (meq l ⁻¹)	4,2	3,8	3,3	3,5	3,5	3,6	4,8	4,4	5,3
S.A.	0,5	0,2	0,2	0,3	0,8	0,1	0,2	0,4	0,7
N	4	5	6	4	4	4	5	4	4
[Mg ²⁺] (meq l ⁻¹)	83,1	79,6	74,2	74,5	66,0	67,9	50,7	52,1	52,0
S.A.	9,5	1,6	10,3	9,7	16,5	8,4	12,8	1,6	4,5

Tabelle 6.4 Konzentration der Kationen K⁺, Na⁺, Ca²⁺ und Mg²⁺ in der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas rugipes* in meq l⁻¹. Der Stichprobenumfang ist unterschiedlich und deswegen für jedes Ion angegeben.

Alter	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
N	4	5	4	5	5	4	5	6	4
[Ca ²⁺] (meq l ⁻¹)	1,3	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0
S.A.	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3
N	4	5	4	5	5	4	5	6	4
[K ⁺] (meq l ⁻¹)	109,9	120,3	124,1	123,4	124,0	120,1	131,3	117,0	122,6
S.A.	11,5	11,7	13,9	25,3	14,3	19,9	21,5	15,7	9,0
N	4	5	4	5	5	4	5	6	4
[Mg ²⁺] (meq l ⁻¹)	51,7	62,8	59,0	60,9	60,2	57,1	49,2	56,4	50,7
S.A.	8,2	6,9	3,1	12,1	6,4	18,8	7,5	7,0	3,5
N	4	5	4	5	5	4	5	6	4
[Na ⁺] (meq l ⁻¹)	33,2	40,0	36,3	35,4	36,5	35,6	37,1	34,1	36,4
S.A.	3,7	8,3	5,2	6,9	4,5	8,7	3,4	4,8	2,2

Tabelle 6.5 Konzentration der Kationen Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ und Na⁺ im Homogenat der Puppen von *Zophobas rugipes* in meq l⁻¹. Der Stichprobenumfang ist unterschiedlich und deswegen für jedes Ion angegeben.

Alter	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
N	6	6	6	5	10	10	4	7	7
[Cl ⁻] (meq l ⁻¹)	77,3	78,1	77,2	74,1	78,4	74,7	72,6	64,8	65,7
S.A.	5,7	4,6	5,0	4,8	6,9	4,0	2,4	5,5	7,6

Tabelle 6.6 Chloridkonzentration in der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas rugipes* in meq l⁻¹.

Alter	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Entwicklung (%)	8,3	16,6	24,9	33,2	41,5	49,8	58,1	66,4	74,7	83	91,3
N	10	12	12	11	10	10	12	12	4	7	7
[Protein] (g l ⁻¹)	48,1	53,9	54,4	57,1	53,5	56,9	49,1	49,3	42,1	38,6	42,4
S.A.	7,3	7,0	9,0	12,9	9,8	12,7	15,3	18,1	9,8	8,7	9,0

Tabelle 6.7 Proteinkonzentration in der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas rugipes* in g l⁻¹.

Alter	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
N	8	9	8	5	5	5	5	5	5
Osmolarität (mmol kg ⁻¹)	371,9	355,0	345,4	355,6	340,8	326,4	347,2	341,6	350,2
S.A.	14,6	11,1	13,6	12,6	6,3	4,5	8,0	14,8	9,5

Tabelle 6.8 Osmolarität der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas rugipes* in mosmol kg⁻¹.

Alter (Tage)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
N	4	5	5	5	5	4	5	5	5
Ala	1,9	1,2	0,9	1,1	1,2	1,7	1,9	1,4	1,7
S.A.	0,5	0,6	0,5	0,5	0,3	0,6	0,7	0,6	0,8
Arg	1,6	2,2	2,2	1,6	1,8	1,5	1,8	1,3	1,4
S.A.	0,7	0,6	0,8	0,7	0,6	0,8	0,9	0,4	0,7
Asp	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cys	0	tr	tr	tr	tr	tr	0	0	0
Glu	0	tr	tr	0	0	0	0	0	0
Gly	2,6	1,6	1,8	2,2	3,0	3,4	3,4	2,2	1,8
S.A.	0,6	0,2	0,6	0,5	0,9	1,3	1,2	0,4	0,8
His	7,3	4,2	5,6	6,4	8,5	7,9	6,9	4,7	3,1
S.A.	3,3	1,3	2,1	0,4	1,8	1,7	2,2	1,8	1,8
Ile	0,8	1,3	1,3	1,6	1,2	1,2	1,6	1,4	0,8
S.A.	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3	0,5	0,4	0,2
Leu	1,0	1,1	0,9	1,3	2,1	1,9	2,1	2,6	3,6
S.A.	0,4	0,6	0,4	0,9	1,1	0,9	0,9	0,6	1,2
Lys	3,0	4,9	12,5	14,7	13,7	15,8	12,3	10,2	6,9
S.A.	1,8	2,3	3,9	2,4	2,4	4,0	3,2	3,9	3,5
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0,5	0,3	0,5	0,6	0,7	0,7	0,9	1,0	1,5
S.A.	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2
Pro	8,7	8,2	7,2	7,1	5,7	5,8	3,5	2,8	2,8
S.A.	1,7	1,6	1,8	2,3	1,2	1,1	0,8	1,0	1,6
Ser	2,7	2,4	2,6	2,9	3,5	3,8	3,4	3,0	1,9
S.A.	0,1	0,4	0,8	0,4	0,6	0,9	0,7	0,5	0,2
Thr	1,2	1,2	1,1	1,5	1,9	2,4	1,8	1,4	2,4
S.A.	0,1	0,6	0,5	0,6	0,7	0,5	0,6	0,5	1,0
Trp	0,6	0,9	1,3	1,2	1,5	1,6	1,5	1,3	1,0
S.A.	0,1	0,4	0,5	0,3	0,3	0,5	0,2	0,2	0,4
Tyr	2,3	0,0	0,2	1,2	2,3	3,9	4,8	5,4	6,3
S.A.	1,1	0,0	0,4	0,3	0,7	0,9	1,6	2,3	1,5
Val	5,2	0,8	0,6	1,0	1,2	1,6	1,4	0,9	2,0
S.A.	1,4	1,2	1,0	1,0	1,1	1,5	1,3	1,2	2,7
Gesamt	39,5	30,7	39,5	45,2	49,6	54,7	48,5	40,5	38,6
S.A.	9,0	7,2	9,7	10,2	7,5	9,1	8,9	5,9	9,3

Tabelle 6.9 Aminosäurekonzentrationen der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas rugipes* in mmol l⁻¹.

Gly	50	60	70	90				
20	P ≤ 0,05	P ≤ 0,01	P ≤ 0,001	N.S.				
30	N.S.	P ≤ 0,01	P ≤ 0,01	N.S.				
60			N.S.	P ≤ 0,05				
70				P ≤ 0,05				
His	50	60						
90	P ≤ 0,01	P ≤ 0,05						
Leu	10	20	30	40	50	60	70	
80	P ≤ 0,05	P ≤ 0,05	P ≤ 0,01	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	
90	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,05	P ≤ 0,01	P ≤ 0,05	
Lys	30	40	50	60	70	80	90	
10	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,05	N.S.	
20	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,01	N.S.	N.S.	
30		N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	P ≤ 0,05	
40			N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	P ≤ 0,01	
50				N.S.	N.S.	N.S.	P ≤ 0,01	
60					N.S.	N.S.	P ≤ 0,001	
Phe	10	20	30	40	50	60	70	80
50	N.S.	P ≤ 0,05	N.S.	N.S.				
60	N.S.	P ≤ 0,05	N.S.	N.S.	N.S.			
70	N.S.	P ≤ 0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.		
80	P ≤ 0,01	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,01	N.S.	N.S.	N.S.	
90	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,01	P ≤ 0,01
Pro	10	20	30	40	50	60		
50	P ≤ 0,05	P ≤ 0,05	N.S.	N.S.				
60	P ≤ 0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.			
70	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	N.S.	N.S.		
80	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,05	P ≤ 0,05		
90	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,05	P ≤ 0,05		



Ser	10	20	30	50	60	70
50	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,05$	N.S.			
60	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$	N.S.		
70	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,05$	N.S.	N.S.	N.S.	
90	N.S.	N.S.	N.S.	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$

Trp	30	40	50	60	70	80	90
10	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,05$	N.S.
20	N.S.	N.S.	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$	N.S.	N.S.
60					N.S.	N.S.	$P \leq 0,05$

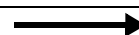
Tyr	10	20	30	40	50
60	N.S.	N.S.	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,05$	N.S.
70	N.S.	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,05$
80	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,01$
90	$P \leq 0,01$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$

Tabelle 6.10 Statistische Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Unterschiede einzelner Aminosäurekonzentrationen in der Hämolymphe des Schwarzkäfers *Zophobas rugipes* während der Puppenentwicklung. Aufgeführt sind nur die Aminosäuren, bei denen statistisch signifikante Konzentrationsänderungen nachgewiesen wurden. Die statistische Analyse erfolgte durch paarweisen parametrischen Vergleich aller Altersstufen nach Tukey-Kramer. Die Wertepaare sind nach dem Alter der Puppen in % des gesamten Puppenstadiums aufgeschlüsselt. Nicht angegebene Wertepaare sind statistisch nicht signifikant unterscheidbar. (N.S. nicht signifikant)

Alter (Tage)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
N	4	5	5	5	5	4	5	5	5
Ala	13,0	6,9	4,4	3,7	3,7	5,6	4,3	4,2	3,5
S.A.	1,6	4,6	0,6	1,8	0,6	3,6	1,8	0,7	1,1
Arg	11,5	11,8	8,0	8,8	9,4	9,9	9,9	9,5	7,9
S.A.	2,4	1,6	0,3	4,0	0,8	3,8	3,4	2,4	2,1
Asp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cys	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Glu	5,6	8,9	2,5	3,1	4,9	5,3	6,4	11,1	5,4
S.A.	3,0	0,8	0,1	1,8	2,6	3,9	3,6	10,0	4,8
Gly	10,4	7,2	5,2	6,2	7,5	5,7	9,1	6,2	6,0
S.A.	1,1	0,7	0,5	2,9	1,0	4,1	2,7	1,3	0,9
His	7,7	9,4	5,0	5,0	7,8	7,4	6,2	8,4	4,1
S.A.	1,8	6,2	0,6	2,5	3,4	2,5	0,3	4,4	0,6
Ile	4,4	4,3	1,3	2,1	1,8	2,7	2,5	3,8	3,6
S.A.	0,7	1,7	1,8	2,9	1,6	3,3	1,8	0,4	0,0
Leu	5,8	4,9	4,1	3,0	4,2	4,4	5,7	6,7	7,8
S.A.	1,0	2,0	0,3	4,3	0,5	3,4	1,2	1,5	0,2
Lys	3,9	15,4	9,6	9,3	11,2	10,3	8,1	8,7	5,8
S.A.	1,2	1,6	0,0	2,7	1,9	3,0	2,6	2,9	1,0
Met	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Phe	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,7	3,6
S.A.	1,3						1,2	1,3	1,3
Pro	31,9	16,9	17,2	14,8	12,1	11,9	7,6	7,6	6,1
S.A.	1,1	1,8	0,3	4,1	2,9	3,5	1,7	0,8	0,7
Ser	7,5	6,0	4,5	5,2	6,0	5,0	6,1	5,8	6,1
S.A.	0,9	0,3	0,2	2,9	0,7	1,3	1,4	1,2	1,4
Thr	7,6	4,3	4,9	5,1	4,8	4,9	5,4	2,7	3,5
S.A.	1,0	1,9	1,1	1,8	1,3	1,5	1,8	1,5	1,1
Trp	18,0	25,7	22,5	24,3	26,1	22,1	18,5	19,4	18,0
S.A.	1,2	4,2	2,2	14,8	3,0	6,9	2,7	4,4	3,8
Tyr	4,0	1,4	0,0	0,0	0,9	0,5	2,4	4,1	5,7
S.A.	1,5	2,0			1,3	1,0	1,6	2,2	1,6
Val	2,0	3,2	0,0	1,8	1,8	4,3	5,0	4,6	5,8
S.A.	0,2	4,5		2,6	1,8	3,7	1,2	0,8	0,4
Gesamt	137,3	128,1	90,9	93,8	104,1	101,6	99,7	104,3	94,8
S.A.	13,6	5,6	10,5	5,1	11,9	37,5	24,2	16,5	17,8

Tabelle 6.11 Aminosäurekonzentrationen im Homogenat der Puppen von *Zophobas rugipes* in mmol l⁻¹.

Alter (Tage)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Wasserfraktionen:									
F Gew	0,64	0,66	0,57	0,57	0,59	0,61	0,66	0,70	0,65
F HL	0,36	0,34	0,43	0,43	0,41	0,39	0,34	0,30	0,35
[Ca ²⁺] (meq l ⁻¹)	-0,3	-0,5	-0,4	-0,9	-1,3	-0,7	-1,0	-0,4	-1,3
max	0,6	0,2	0,4	0,2	0,5	0,1	-0,4	0,2	0,0
min	-1,1	-1,1	-1,1	-1,9	-2,9	-1,5	-1,6	-1,0	-2,6
[K ⁺] (meq l ⁻¹)	159,0	170,1	201,7	193,4	194,5	185,5	185,8	153,6	177,1
max	193,9	204,3	236,2	257,8	246,5	241,9	231,3	184,0	207,1
min	128,7	140,5	169,4	135,3	150,6	136,4	142,7	124,4	148,7
[Mg ²⁺] (meq l ⁻¹)	33,9	53,9	47,7	50,7	56,2	50,0	48,4	58,3	50,0
max	57,6	72,2	65,2	84,2	88,1	96,7	70,4	71,1	61,1
min	13,2	38,1	30,8	20,4	28,4	9,1	26,9	46,0	39,5
[Na ⁺] (meq l ⁻¹)	21,5	33,5	20,4	21,0	24,5	17,7	25,8	24,1	24,0
max	31,4	53,4	35,0	38,7	38,3	43,9	38,5	35,3	31,0
min	13,0	16,1	6,5	5,0	12,8	-5,7	13,2	13,2	17,5
[Cl ⁻] (meq l ⁻¹)	12,1	13,3	4,5	8,9	13,0	11,5	21,3	30,5	24,4
max	21,5	22,3	14,9	18,6	30,7	22,4	34,5	41,0	36,9
min	3,8	5,4	-5,4	0,0	-2,3	1,9	8,7	20,3	12,6
Proteine (g l ⁻¹)	52,1	50,0	47,2	46,8	48,6	51,9	55,0	57,1	60,5
max	72,4	69,6	68,3	68,1	73,1	75,1	72,3	71,0	77,8
min	34,3	32,6	26,9	27,4	27,4	30,9	38,0	43,5	44,1
Ala (mmol l ⁻¹)	19,2	9,9	7,0	5,6	5,4	8,1	5,5	5,4	4,5
max	23,8	18,7	8,8	9,6	7,3	15,7	9,0	6,8	6,9
min	15,1	2,3	5,3	1,9	3,7	1,6	2,3	4,0	2,1
Arg (mmol l ⁻¹)	17,1	16,8	12,3	14,1	14,6	15,4	14,1	13,0	11,3
max	22,9	21,1	14,1	22,9	18,0	24,1	20,5	17,0	15,5
min	12,0	13,0	10,7	6,2	11,8	7,9	8,1	9,1	7,4
Glu (mmol l ⁻¹)	8,7	13,6	4,4	5,4	8,3	8,7	9,7	15,8	8,4
max	14,5	16,0	4,7	9,0	13,9	16,4	15,6	30,8	16,4
min	3,8	11,6	4,1	2,2	3,6	2,0	4,1	1,5	0,9
Gly (mmol l ⁻¹)	14,8	10,2	7,7	9,1	10,6	7,2	12,1	7,9	8,2
max	18,1	12,3	9,3	15,3	14,3	16,2	17,5	10,2	10,4
min	11,8	8,3	6,1	3,5	7,4	-0,7	7,0	5,7	6,2
His (mmol l ⁻¹)	8,0	12,2	4,6	4,0	7,3	7,1	5,8	10,1	4,7
max	13,8	24,2	7,6	9,2	16,1	13,7	7,8	17,6	6,8
min	2,9	1,7	1,6	-0,7	-0,1	1,3	3,7	2,8	2,6



Alter (Tage)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ile (mmol l ⁻¹)	6,4	5,9	1,3	2,4	2,2	3,6	2,9	4,8	5,1
max	8,4	9,5	5,0	8,3	5,7	10,1	6,1	5,7	5,5
min	4,7	2,7	-2,2	-2,9	-0,8	-2,0	-0,1	4,0	4,8
Leu (mmol l ⁻¹)	8,6	6,9	6,6	4,3	5,6	6,0	7,5	8,4	10,0
max	11,3	11,2	7,8	13,1	7,9	13,1	10,2	11,1	11,5
min	6,3	3,2	5,4	-3,7	3,6	-0,2	5,0	5,9	8,6
Lys (mmol l ⁻¹)	4,4	20,8	7,4	5,2	9,4	6,7	6,0	8,1	5,2
max	7,9	26,4	11,1	12,6	16,2	16,1	12,4	14,4	9,0
min	1,4	15,9	3,8	-1,4	3,6	-1,8	-0,2	2,0	1,6
Phe (mmol l ⁻¹)	0,9	-0,2	-0,3	-0,4	-0,5	-0,5	0,4	0,5	4,8
max	3,3	-0,1	-0,2	-0,3	-0,3	-0,4	2,4	2,5	7,1
min	-1,2	-0,2	-0,5	-0,5	-0,6	-0,6	-1,4	-1,4	2,6
Pro (mmol l ⁻¹)	45,0	21,5	24,8	20,6	16,5	16,0	9,7	9,6	7,9
max	51,7	27,1	27,9	31,2	24,7	24,5	13,1	11,4	10,3
min	39,2	16,5	21,7	11,0	9,6	8,5	6,4	7,9	5,7
Ser (mmol l ⁻¹)	10,8	7,9	5,9	6,9	7,7	5,7	7,4	7,0	8,4
max	13,7	9,3	7,2	13,0	10,2	9,3	10,4	9,2	11,1
min	8,2	6,8	4,7	1,3	5,5	2,5	4,5	4,8	5,8
Thr (mmol l ⁻¹)	11,1	6,0	7,7	7,7	6,9	6,5	7,2	3,2	4,0
max	13,8	9,9	10,4	11,9	10,6	10,1	10,6	5,7	6,5
min	8,9	2,6	5,2	3,9	3,7	3,3	4,0	0,8	1,8
Trp (mmol l ⁻¹)	27,8	38,8	38,3	41,3	43,3	35,5	27,2	27,3	27,0
max	32,1	49,0	44,1	71,1	53,4	51,1	32,7	34,4	34,4
min	24,1	30,0	32,8	14,6	34,8	22,0	22,2	20,4	20,2
Tyr (mmol l ⁻¹)	1,0	3,0	-0,2	-0,9	0,6	-1,0	0,0	0,8	-0,9
max	8,5	5,6	0,1	-0,7	2,9	0,6	4,8	7,8	9,0
min	1,9	-0,8	-0,5	-1,1	-2,6	-3,9	-2,3	-0,7	1,8
Val (mmol l ⁻¹)	0,3	4,4	-0,5	2,5	2,2	6,0	6,9	6,2	7,8
max	1,5	12,8	0,3	8,3	6,6	14,3	9,7	8,1	10,3
min	-0,9	-2,9	-1,2	-2,7	-1,6	-1,2	4,1	4,5	5,3
Sum (mmol l ⁻¹)	193,0	179,3	129,3	129,9	142,0	132,2	126,0	131,7	124,8
max	232,4	203,5	155,0	147,5	180,4	213,3	171,1	159,5	159,6
min	158,9	158,4	105,2	114,1	109,9	62,4	84,0	105,1	92,5

Tabelle 6.12 Berechnete Konzentrationen der untersuchten Substanzen im Gewebe der Puppen von *Zophobas rugipes*. Die oberen (max) bzw. unteren Grenzen (min) errechnen sich aus Grenzwerten, die durch die Standardabweichungen der Messergebnisse vorgegeben sind. Negative Werte werden aufgrund der implizierten Messfehler als „nicht vorhanden“ angesehen. Diese Tabellenfelder sind grau hinterlegt

Alter (Tage)		0	1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklung (%)		10	20	30	40	50	60	70	80	90
Hämolymphe										
a	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,057
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,422	0,423	0,422	0,421	0,422	0,421	0,422	0,424	0,425
a_{\max}	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,420	0,422	0,420	0,419	0,419	0,418	0,419	0,421	0,421
a_{\min}	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,057	0,057	0,057	0,057	0,057	0,056	0,057	0,057	0,057
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,424	0,425	0,424	0,424	0,425	0,424	0,425	0,426	0,428
Homogenat										
a	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,055	0,054	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,409	0,408	0,412	0,412	0,410	0,412	0,411	0,411	0,412
a_{\max}	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,405	0,404	0,408	0,407	0,406	0,403	0,404	0,406	0,408
a_{\min}	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,055	0,055	0,056	0,056	0,055	0,056	0,056	0,056	0,055
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,414	0,412	0,416	0,418	0,415	0,421	0,418	0,417	0,416
Gewebe										
a	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,054	0,053	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054	0,054
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,402	0,400	0,405	0,405	0,402	0,406	0,405	0,406	0,406
a_{\max}	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,052	0,052	0,052	0,052	0,051	0,051	0,052	0,053	0,053
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,389	0,388	0,394	0,390	0,386	0,382	0,389	0,396	0,395
a_{\min}	mmol l ⁻¹ Torr ⁻¹	0,055	0,055	0,055	0,056	0,056	0,057	0,056	0,055	0,055
	mmol l ⁻¹ kPa ⁻¹	0,413	0,410	0,416	0,419	0,416	0,426	0,419	0,416	0,416

Tabelle 6.13 Physikalischer Löslichkeitskoeffizient α für Kohlendioxid in Hämolymphe, Gewebe und Homogenat der Puppen von *Zophobas rugipes*. „min“ und „max“ beziehen sich dabei auf Werte, die durch Einsetzen der entsprechenden oberen (max) bzw. unteren (min) Grenzwerte der Einflussgrößen errechnet wurden.

Alter (Tage)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Entwicklung (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Hämolymphe									
pK	6,178	6,178	6,179	6,177	6,182	6,181	6,191	6,193	6,196
pK _{max}	6,170	6,174	6,173	6,170	6,172	6,174	6,181	6,187	6,187
pK _{min}	6,189	6,186	6,192	6,193	6,202	6,197	6,210	6,206	6,211
Homogenat									
pK	6,186	6,174	6,178	6,177	6,176	6,179	6,180	6,180	6,182
pK _{max}	6,180	6,171	6,174	6,167	6,171	6,167	6,172	6,174	6,179
pK _{min}	6,200	6,190	6,190	6,198	6,191	6,203	6,197	6,196	6,192
Gewebe									
pK	6,190	6,172	6,177	6,177	6,171	6,178	6,174	6,174	6,175
pK _{max}	6,167	6,155	6,157	6,144	6,142	6,140	6,151	6,159	6,160
pK _{min}	6,228	6,207	6,210	6,228	6,215		6,213	6,202	6,200

Tabelle 6.14 pK-Werte für die Reaktion von Kohlendioxid mit Wasser in Hämolymphe, Gewebe und Homogenat der Puppen von *Zophobas rugipes*. „min“ und „max“ beziehen sich dabei auf Werte, die durch Einsetzen der entsprechenden oberen (max) bzw. unteren (max) Grenzwerte der Einflussgrößen errechnet wurden. Der minimale pK-Wert bei 5 Tagen konnte wegen einer negativen minimalen Natriumkonzentration nicht berechnet werden.

Alter (Tage)		0	1	3	5	8	Gesamt
Entwicklung (%)		10	20	40	60	90	
P_{CO_2} (kPa/Torr)	C_{CO_2} (mmol l ⁻¹)						
1,99/14,9	MW	9,77	11,83	11,97	12,11		11,42
	S.A.	0,34	0,07	0,07	0,35		1,11
3,98/29,9	MW	13,48	15,70	15,38	16,56	14,65	15,15
	S.A.	0,45	0,08	0,84	0,30	0,24	1,16
7,97/59,8	MW	18,59	20,38	21,41	21,06	19,76	20,24
	S.A.	0,28	0,13	0,29	0,19	0,50	1,12

Tabelle 6.15 *In vitro* CO₂-Gehalt in der Hämolymphe der Puppen von *Zophobas rugipes* in Abhängigkeit vom CO₂-Partialdruck. Der CO₂-Gehalt von 8 Tage alten Puppen bei 1,99 kPa wurde nicht ermittelt. Für die Messung wurde die Hämolymphe mehrerer Puppen vereinigt.

Alter (Tage)		0	1	3	5	7	8	Gesamt
Entwicklung (%)		10	20	40	60	80	90	
P_{CO_2} (kPa/Torr)	C_{CO_2} (mmol l ⁻¹)							
1,95/14,6	MW	5,84	6,49	5,87	7,15	6,43	5,55	6,22
	S.A.	0,94	0,32	0,79	1,11	0,67	0,66	0,75
3,83/28,7	MW	8,86	9,28	9,18	10,52	9,99	9,05	9,48
	S.A.	0,42	0,36	0,99	0,12	0,37	0,46	0,45
7,38/58,7	MW	14,47	13,40	13,84	14,72	14,20	13,96	14,10
	S.A.	0,80	0,45	1,13	0,89	1,58	1,48	1,06

Tabelle 6.16 *In vitro* CO₂-Gehalt im Homogenat der Puppen von *Zophobas rugipes* in Abhängigkeit vom CO₂-Partialdruck.

Puppe	Alter (d)	Gewicht (g)	Luftdruck (kPa)	Kohlendioxidpartialdrücke während Hyperkapnie (kPa)				t _{Hyp} (h)	
3603	3	0,816	100,60	1,00	6,37	11,72		3	6
3652	3	0,713	101,43	1,01	3,68	11,82		3	6
3673	4	0,720	100,74	1,01	3,66	8,92		3	6
3710	4	0,653	100,86		3,66	6,39	11,75	3	6
3780	3	0,647	101,71		6,44	11,85	20,00	3	6
3803	4	0,647	102,00		3,71	6,46	9,04	3	6
3882	3	0,587	99,40		6,29	8,80	19,54	6	12
3959	4	0,665	102,77		6,51	9,11	11,97	6	12
3972	5	0,608	99,35	0,99	3,61	8,80		6	12
2477	3	0,555	101,24				99,9	1	12
2561	3	0,621	101,78				100,5	1	12
2548	4	0,652	101,60				100,3	1	12
2598	4	0,644	101,17				99,9	1	12

Tabelle 6.17 Hyperkapnieversuche bei Puppen von *Zophobas rugipes*. Jede Puppe wurde drei verschiedenen CO₂-Partialdrücken ausgesetzt. Die CO₂-Partialdrücke unterschieden sich trotz gleicher Einstellung der Gasmischpumpe aufgrund des schwankenden Luftdrucks. In der Spalte t_{Hyp} sind links die Hyperkapniezeiten, rechts die Normokapniezeiten in Stunden angegeben.

7. Publikationen

A. Kaiser, L.T. Wasserthal, S.K. Hetz:

Spiracular occlusion and its influence on the respiratory cycle of lepidopterous pupae
Meeting of the Society of Experimental Biologists, 1996, Lancaster, Großbritannien

S.K. Hetz, A. Kaiser, N. Heisler:

Effects of changing ambient oxygen partial pressure on spiracular activity in butterfly pupae
Meeting of the Society of Experimental Biologists, 1996, Lancaster, Großbritannien

A. Kaiser, L.T. Wasserthal, S.K. Hetz, N. Heisler:

Stigmenbewegungen bei Schmetterlingspuppen: Amplituden- oder Frequenzmodulation?
Tagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, 1996, Oldenburg

A. Kaiser, S.K. Hetz, N. Heisler:

Einfluß einer langandauernden Hyperkapnie auf den Säure-Basen-Haushalt diapausierender Schmetterlingspuppen (*Attacus atlas*)
Tagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, 1997, Mainz

A. Kaiser, N. Heisler, S.K. Hetz:

Discontinuous CO₂ release: can diapausing moth pupae compensate hypercapnia?
Internat. Conference of Comparative Physiology and Biochemistry, 1997, Skukuza, Südafrika

A. Kaiser, S.K. Hetz, N. Heisler:

The role of the hemolymph in discontinuous CO₂ release of diapausing moth pupae: Hypercapnia, hypocapnia and compensation,
Vlth European Congress of Entomology, 1998, České Budejovice, Tschechische Republik

S. Gierth, A. Kaiser, S. K. Hetz, N. Heisler:

Metabolism and respiratory pattern during the pupal development of *Zophobas rugipes*,
Tagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, 1999, Innsbruck, Österreich

S. Gierth, A. Kaiser, S.K. Hetz, N. Heisler:

Metabolism and respiratory patterns in pupae of the tenebrionid beetle *Zophobas rugipes*,
Journal of Insect Physiology, in Vorbereitung

A. Kaiser, N. Heisler:

Amino acids in pupae of the tenebrionid beetle *Zophobas rugipes*
Amino Acids, in Vorbereitung

Alexander Kaiser

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Alexander Kaiser
Anschrift: Krefelder Str. 4, 10555 Berlin
Telefon: 030 - 3910 2542
Geburtsdatum: 18.10.1967
Familienstand: ledig

Schulbildung:

Sep. 1974 - Jul. 1977 Grundschole Klasse 1-3 Deutsche Schule Teheran
Sep. 1977 - Juli 1978 Grundschole Klasse 4 Volksschole Hilpoltstein
Sep. 1978 - Juli 1987 Neusprachliches Gymnasium Hilpoltstein

zwischenzeitlich:

Freiwilliger Sozialdienst Betreuung Behinderter in der Schreinerei des Heims für Menschen mit geistiger Behinderung Auhof

Wehrdienst:

Jan. 1988 - Mär. 1989 Wehrdienst Otto-Lilienthal-Kaserne Roth

Studium:

WS 1989/90 - SS 1995 Studium der Biologie
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zoologie I: „Zur Funktion der Stigmen bei Schmetterlingspuppen der Gattungen Attacus, Ornithoptera und Actias.“

beruflicher Werdegang:

Sep. 1995 - Aug. 2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Tierphysiologie,
Humboldt-Universität zu Berlin
Beginn der Promotion

Berlin, den 10. Oktober 2002

Alexander Kaiser

9. Erklärung

Ich erkläre, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, 10. Oktober 2002

Alexander Kaiser
